



**CONTRIBUCIÓN AL ESTABLECIMIENTO DE
PARÁMETROS DE CALIDAD Y RANGOS DE
VARIACIÓN PARA MATERIAL VEGETAL DE
Momordica charantia L. PROVENIENTE DE
INDIVIDUOS SILVESTRES Y DE CULTIVO**

Laura Marcela Carlos Navarro

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2014

CONTRIBUCIÓN AL ESTABLECIMIENTO DE PARÁMETROS DE CALIDAD Y RANGOS DE VARIACIÓN PARA MATERIAL VEGETAL DE *Momordica charantia* L. PROVENIENTE DE INDIVIDUOS SILVESTRES Y DE CULTIVO

Laura Marcela Carlos Navarro

Directora:

Ph.D. Pilar Ester Luengas Caicedo

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias Farmacéuticas

Línea de Investigación
Farmacognosia y Fitoquímica

Grupo de Investigación
Grupo de Investigación en Tecnología de Productos Naturales - TECPRONA

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Farmacia
Bogotá, Colombia
2014

CONTRIBUTION TO THE ESTABLISHMENT OF QUALITY PARAMETERS AND VARIATION RANGES FOR *Momordica charantia* L. FROM WILD AND CROP PLANTS

Laura Marcela Carlos Navarro

Thesis for the degree of:
Master in Pharmaceutical Sciences

Supervisor:
Ph.D. Pilar Ester Luengas Caicedo

Research Line:
Pharmacognosy and Phytochemistry

Research group
Research group in Technology of Natural Products- TECPRONA

Universidad Nacional de Colombia
Faculty of Science
Department of Pharmacy
Bogota, Colombia
2014

Dedico este trabajo de grado a mis padres, mis hermanos y sobrinos quienes han sido mi motivación y un apoyo fundamental desde que inicié mis estudios

“Estoy convencido que la mitad de lo que separa a los emprendedores con éxito y los que no tienen éxito es la pura perseverancia. Es tan difícil, pones tanto de tu vida en esto, hay momentos tan duros en que la mayoría se da por vencida, no los culpo, es muy difícil y consume gran parte de tu vida. (...) A menos que tengas mucha pasión en lo que haces no vas a sobrevivir, vas a darte por vencido”.

Steve Jobs.

AGRADECIMIENTOS

A mis Padres María Inés y Jaime Roberto por darme la motivación y la fortaleza para iniciar y culminar mis estudios.

A mis hermanas y sobrinos por el amor que me han brindado.

A mi hermano Alejandro por ser un ejemplo de vida y superación.

Al Departamento de Farmacia por el esfuerzo de llevar la Maestría en Ciencias Farmacéuticas a la sede Palmira y darnos la oportunidad de continuar nuestro desarrollo académico en el programa extramuros.

A los profesores que hicieron parte del programa por el esfuerzo de trasladarse permanentemente y la disposición para atendernos.

Al profesor Manuel Salvador Sánchez y colaboradores, por ayudarme con el desarrollo del cultivo de *Momordica charantia* L. y soporte desde la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

A la profesora Pilar Luengas por todo el tiempo, sus conocimientos y enseñanzas a lo largo del desarrollo de este trabajo.

A los profesores Jaiver Rosas y Diana Marcela Aragón que me han brindado su apoyo y disponibilidad siempre para acceder a algunos equipos claves en mi proyecto.

A la profesora Adelina del Pilar Meléndez por dedicar su tiempo a asesorarme y acompañarme durante los análisis microbiológicos del material vegetal.

RESUMEN

Momordica charantia L. (Cucurbitaceae), conocida en Colombia como balsamina, es una planta medicinal reconocida por su actividad hipoglicemiante. Actualmente se viene utilizando tanto el material vegetal proveniente de cultivo, como de crecimiento silvestre para la elaboración de productos fitoterapéuticos. Sin embargo se desconoce el impacto de la fuente de obtención de la droga cruda sobre la calidad de los mismos y no se dispone de una monografía o guía de control de calidad para su análisis.

Con el objetivo de aportar información que sirviera como herramienta para su control de calidad y como recomendación en la elaboración de extractos, se realizó el análisis comparativo de muestras de ejemplares silvestres y de cultivo, obtenidas bajo condiciones controladas. Al material vegetal se le realizaron los siguientes ensayos: descripción macroscópica y microscópica, pérdida por secado, granulometría, material extraíble contenido de cenizas, índice de espuma y caracterización microbiológica. Se realizaron perfiles por cromatografía en capa delgada para extractos acuosos, etanólicos e hidroetanólicos, enfocados a la detección y/o confirmación de metabolitos secundarios reportados en la literatura y a la comparación entre las muestras. Se encontraron algunas diferencias en los resultados de los análisis fisicoquímicos, microbiológicos y fitoquímicos realizados, sin embargo, lograron establecerse algunos rangos para los parámetros cuantitativos y los perfiles de cromatografía en capa delgada, que sirven como referencia para el control de calidad de la materia prima y son un aporte hacia la generación de una monografía de análisis para esta droga.

Palabras clave

Momordica charantia L., Cucurbitaceae, cultivo, control de calidad, plantas medicinales, extractos de plantas.

ABSTRACT

Momordica charantia L. (Cucurbitaceae) called *Balsamina* in Colombia, is a medicinal plant known due to hypoglycemiant activity. Currently the raw material from wild and crop plants is used to prepare herbal products, however its impact is unknown in the quality of product, besides it is not available a quality monograph for analysis.

In order to contribute with information to serve as a guide for quality control and to recommend the best conditions for preparation of extracts, it was done comparative analysis of samples from wild and crop plants obtained under controlled conditions. The following tests were performed for herbal material samples: macroscopic and microscopic characterization, loss on drying, particle size, extractable material, ash, foaming index and microbiological analysis. Thin layer chromatography was carried out to stablish fingerprints of water, hydroalcoholic and alcoholic extracts focused to identify and confirm secondary metabolites reported in literature and comparative of samples.

Most appropriated conditions about the raw material post-harvest management as well as the specific methodology for each analysis of *Momordica charantia* L. samples were defined. Some differences were observed in physicochemical, phytochemical and microbiological test results, among the samples. The specifications ranges for a quantitative analysis and the thin layer chromatography profiles were established which serve as a reference to quality control of herbal drug and is the base to prepare a quality monograph.

Key Words

Momordica charantia L., Cucurbitaceae, Agricultural crop, Quality control, medicinal plants, plants extracts.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	VI
ABSTRACT	VII
Listado de Tablas	XI
Tabla de Figuras	XV
Tabla de Gráficos	XVI
Lista de Símbolos y Abreviaturas	XVIII
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEORICO	5
2.1 Fitoterapia	5
2.2 Diabetes Mellitus	6
2.2.1 Patología	6
2.2.2. Síntomas	8
2.2.3 Prevalencia de Diabetes.....	8
2.2.4 Tratamiento de Diabetes	10
2.2.5 Fitoterapia para el tratamiento de la diabetes.....	11
2.3 <i>Momordica charantia</i> L.....	13
2.3.1 Cucurbitáceas.....	13
2.3.2 Género <i>Momordica</i>	13
2.3.3 Especie <i>Momordica charantia</i> L.....	14
2.4 Control de calidad y Monografías	23
2.5 Legislación Colombiana	26
2.5.1 Productos registrados en Colombia que utilizan droga de <i>Momordica charantia</i> L.	26
3.METODOLOGÍA.....	28
3.1 Listado de equipos	28
3.2 Listado de materiales y reactivos.....	29
3.3 Obtención del material vegetal	30
3.3.1 Colecta	30
3.3.2 Secado	31
3.3.3 Molienda.....	31
3.4 Descripción física del material	32

3.5 Análisis de tamaño de partícula	32
3.6 Análisis de humedad	32
3.7 Material extraíble	33
3.8 Análisis de microscopía.....	33
3.9 Análisis de cenizas totales	34
3.10 Análisis cenizas insolubles en ácido	34
3.11 Proceso de extracción	35
3.12 Índice de espuma	36
3.13 Microbiología	37
3.14 Caracterización de metabolitos secundarios.....	38
3.15 Detección de saponinas.....	49
3.15.1 Detección de Saponinas (Método Sanabria, 1983).....	49
3.15.2 Detección de Saponinas (Método OMS, 2011)	50
3.16 Metodología de cuantificación fenoles totales.....	51
3.17 Análisis estadístico	52
4. RESULTADOS y DISCUSIÓN.....	53
4.1 Obtención del material vegetal	53
4.1.1 Colecta	53
4.2 Secado del material vegetal	55
4.3 Molienda del material vegetal.....	58
4.4 Descripción física del material vegetal fresco.....	58
4.5 Descripción del material vegetal seco entero	60
4.6 Descripción de material vegetal seco /molido	61
4.7 Tamaño de partícula	62
4.8 Humedad residual	64
4.9 Material extraíble	65
4.9.1 Proceso de extracción en frío.....	66
4.9.2 Proceso de extracción en caliente	68
4.9.3 Comparación de los dos métodos de extracción	69
4.9.4 Material extraíble en frutos.....	70
4.10 Análisis Microscópico	72
□ Muestra (S-LI).....	72
□ Muestra (C-Se).....	74
□ Muestra (S-Se)	76
4.11 Evaluación de los frutos	81

4.12 Determinación de presencia de saponinas	84
4.12.1 Índice de espuma	84
4.12.2 Determinación de la presencia de saponinas según metodología (SANABRIA, 1983)	85
4.12.3 Determinación de presencia de Saponinas según método (OMS, 2011)	86
4.13 Cenizas totales	88
4.14 Cenizas insolubles en ácido	89
4.15 Análisis microbiológico	90
4.16 Pruebas de detección de metabolitos secundarios	93
4.16.1 Alcaloides	93
4.16.2 Flavonoides y compuestos fenólicos	98
4.16.3 Compuestos Antracénicos	101
4.16.4 Compuestos terpénicos / esteroidales	106
4.16.5 Glicósidos Cardiotónicos	110
4.17 Cuantificación de fenoles totales	115
4.18 Comparacion entre los resultados de muestras silvestres y de cultivo	120
4.19 Influencia de parámetros de calidad de material vegetal sobre extractos	123
4.20 Propuesta de Monografía de calidad para <i>Momordica charantia</i> L.	124
5. CONCLUSIONES	125
6. RECOMENDACIONES	127
7. ANEXOS	128
ANEXO 7-1. COMPUESTOS QUIMICOS REPORTADOS EN <i>Momordica charantia</i> L.	129
ANEXO 7-2 CONDICIONES AMBIENTALES DE CALI 2013 Y 2014	138
ANEXO 7-3. DIMENSIONES DE LOS FRUTOS DE LAS MUESTRAS DE RECOLECCION SILVESTRE Y DE CULTIVO DE <i>Momordica charantia</i> L.	139
ANEXO 7-4. ESPECIFICACIONES DE REFERENCIA PARA RECuentos Y PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN MUESTRAS DE MATERIAL VEGETAL	142
ANEXO 7-5. RESULTADOS DE RECuentos Y PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATOGENOS EN MUESTRAS DE MATERIAL VEGETAL DE <i>Momordica charantia</i> L.	143
8. BIBLIOGRAFÍA	164

Listado de Tablas

Tabla 2-1. Población de países de Suramérica afectada con diabetes.....	9
Tabla 2-2. Plantas utilizadas en fitoterapia para el tratamiento de la diabetes. Adaptado de Giner y Castillo (2003).	12
Tabla 2-3. Estudios clínicos y preclínicos para evaluación de actividad farmacológica de <i>Momordica charantia</i> L. Adaptado de (Grover, 2004).	17
Tabla 2-4. Estudios de seguridad y toxicidad de extractos de <i>Momordica charantia</i> L.	20
Tabla 2-5. Monografías de referencia para drogas vegetales.	25
Tabla 2-6. Controles de calidad para materias de origen natural según Decreto 3553 de 2004.....	26
Tabla 2-7. Productos fitoterapéuticos y homeopáticos registrados en Colombia ante la entidad regulatoria INVIMA	27
Tabla 3-1. Identificación de las muestras de recolección silvestre y de cultivo utilizadas para el estudio ...	31
Tabla 3-2. Condición de secado de las muestras de <i>Momordica charantia</i> L.	31
Tabla 3-3. Reactivos para identificación microscópica.....	34
Tabla 3-4. Diluciones seriadas para determinación de índice de espuma.....	36
Tabla 3-5. Criterios de evaluación para la determinación del índice de espuma	36
Tabla 3-6. Condición de análisis para indicadores de contaminación microbiológica	37
Tabla 3-7. Condiciones de análisis para caracterización de microorganismos patógenos.....	38
Tabla 3-8. Condiciones de análisis CCD y pruebas cualitativas para detección de Alcaloides.	40
Tabla 3-9. Condiciones de análisis CCD y pruebas cualitativas para detección de Flavonoides	42
Tabla 3-10. Condiciones de análisis CCD y pruebas cualitativas para detección de compuestos Terpénicos/esteroidales	44
Tabla 3-11. Condiciones de análisis CCD y pruebas cualitativas para detección de glicósidos cardiotónicos	46
Tabla 3-12. Condiciones de análisis CCD y pruebas cualitativas para detección de compuestos antracénicos	48
Tabla 3-13. Condiciones de preparación de muestras para determinación de saponinas por hemólisis. ...	50
Tabla 3-14. Diluciones para preparación de muestras para curva de calibración en cuantificación de fenoles totales	51
Tabla 4-1. Condiciones climáticas en la época de colecta de muestras de material vegetal de <i>Momordica charantia</i> L.	53
Tabla 4-2. Identificación de muestras de material vegetal de <i>Momordica charantia</i> L.	53
Tabla 4-3. Información general del cultivo desarrollado en CEUNP.	54
Tabla 4-4. Información de la caracterización del suelo de CEUNP.....	55
Tabla 4-5. Información sobre el proceso de secado de las muestras de material vegetal de <i>Momordica charantia</i> L.....	57
Tabla 4-6. Descripción física de las muestras de material vegetal de <i>Momordica charantia</i> L. seco sin moler.....	61
Tabla 4-7. Descripción física de material vegetal molido de muestras de cultivo y ejemplares de recolección silvestre.....	61
Tabla 4-8. Porcentaje de material vegetal retenido en la batería de tamices para las muestras de material vegetal molido de <i>Momordica charantia</i> L.	62

Tabla 4-9. Resultados humedad residual en muestras de material vegetal molido de <i>Momordica charantia</i> L.....	64
Tabla 4-10. Resultados de material extraíble en proceso en frío y caliente para las muestras de material vegetal de <i>Momordica charantia</i> L.	65
Tabla 4-11. Resultados de análisis ANOVA manteniendo constante el tamaño de la muestra usada para extracción para el proceso en frío.....	66
Tabla 4-12. Resultados de análisis ANOVA para muestras manteniendo constante el solvente para el proceso en frío.....	67
Tabla 4-13. Resultados de análisis ANOVA para muestras manteniendo constante el tamaño de la muestra para el proceso en caliente	68
Tabla 4-14. Resultados de análisis ANOVA manteniendo constante el solvente de extracción para el proceso en caliente.....	69
Tabla 4-15. Resultados de análisis ANOVA para muestras comparando proceso de extracción para muestras de tamaño grueso	69
Tabla 4-16. Resultados de análisis ANOVA manteniendo constante el solvente , en muestras de tamaño fino y diferentes procesos de extracción.....	70
Tabla 4-17. Resultados de material extraíble en proceso en caliente para las muestras de frutos de <i>Momordica charantia</i> L.....	70
Tabla 4-18. Características microscópicas de la muestra de material vegetal (S-LI).	73
Tabla 4-19. Características microscópicas de la muestra de material vegetal (C-Se)	75
Tabla 4-20. Características microscópicas de la muestra de material vegetal (S -Se).....	79
Tabla 4-21. Resultados de dimensiones de frutos de <i>Momordica charantia</i> L.....	81
Tabla 4-22. Resultados de dimensiones de frutos de <i>Momordica charantia</i> L. descartando los valores atípicos	82
Tabla 4-23. Resultados de altura de columna de espuma para determinación de índice de espuma en muestras de extractos de material vegetal de <i>Momordica charantia</i> L.	84
Tabla 4-24. Resultados hemólisis de eritrocitos para detección de saponinas en extractos de diferentes muestras de <i>Momordica charantia</i> L. método referenciado por Sanabria..	85
Tabla 4-25. Resultados hemólisis de eritrocitos para detección de saponinas en extractos de diferentes muestras de <i>Momordica charantia</i> L. utilizando el método referenciado por OMS.....	86
Tabla 4-26. Resultados de cenizas totales en muestras de material vegetal de <i>Momordica charantia</i> L.....	88
Tabla 4-27. Resultados de cenizas insolubles en ácido en muestras de material vegetal de <i>Momordica charantia</i> L.....	89
Tabla 4-28. Resultados recuentos de Microorganismos en muestras de <i>Momordica charantia</i> L.	90
Tabla 4-29. Resultados aislamiento e identificación de microorganismos patógenos en muestras de <i>Momordica charantia</i> L.	92
Tabla 4-30. Identificación de los extractos de material vegetal de <i>Momordica charantia</i> L	93
Tabla 4-31. Resultados de pruebas de detección cualitativa de alcaloides en extractos de <i>Momordica charantia</i> L	94
Tabla 4-32. Resultados Rf de CCD para alcaloides en extractos acuosos	95
Tabla 4-33. Resultados Rf de CCD para alcaloides en extractos hidroalcohólicos	96
Tabla 4-34. Resultados Rf de CCD para alcaloides en extractos hidroalcohólicos de frutos	96
Tabla 4-35. Resultados Rf de CCD para alcaloides en extractos etanólicos	97
Tabla 4-36. Resultados pruebas coloración para flavonoides y compuestos fenólicos para las fases AE y B.....	98
Tabla 4-37. Resultados de CCD para flavonoides en extractos acuosos.....	99
Tabla 4-38. Resultados de CCD para flavonoides en extractos hidroalcohólicos.....	99
Tabla 4-39. Resultados de CCD para flavonoides en extractos hidroalcohólicos de frutos.....	100

Tabla 4-40. Resultados de CCD para flavonoides en extractos etanólicos.....	100
Tabla 4-41. Resultados de pruebas de detección cualitativas para compuestos antracénicos.....	102
Tabla 4-42. Resultados de CCD para compuestos antracénicos en muestras de extracto acuoso	103
Tabla 4-44. Resultados de CCD para compuestos antracénicos en muestras de extractos etanólicos....	105
Tabla 4-45. Resultados de CCD de compuestos terpénicos/esteroidales en muestras de extractos acuosos.....	107
Tabla 4-46. Resultados de CCD de compuestos terpénicos/esteroidales en muestras de extractos hidroalcohólicos.....	108
Tabla 4-47. Resultados de CCD de compuestos terpénicos/esteroidales en muestras de extractos etanólicos.....	109
Tabla 4-48. Resultados de pruebas cualitativas de coloración de compuestos cardiotónico en extractos de <i>Momordica charantia</i> L.....	110
Tabla 4-49. Resultados de CCD de compuestos cardiotónicos en muestras de extractos acuosos	111
Tabla 4-50. Resultados de CCD de compuestos cardiotónicos en muestras de extractos hidroalcohólicos	112
Tabla 4-51. Resultados de CCD de compuestos cardiotónicos en muestras de extractos etanólicos	113
Tabla 4-52. Resultados de cuantificación fenoles totales reportados como μg <i>Acido Gálico</i> / g de extracto.....	115
Tabla 4-53 Valores reportados de contenido de compuestos fenólicos en extractos acuosos para plantas de diferentes familias.....	116
Tabla 4-54. Valores reportados de contenido de compuestos fenólicos en extractos etanólicos para algunas plantas.....	117
Tabla 4-55. Resultados ANOVA para contenido de fenoles totales en muestras de extracto obtenido con material vegetal de tamaño fino.....	118
Tabla 4-56. Resultados ANOVA para contenido de fenoles totales en muestras de extracto obtenido con material vegetal de tamaño grueso	118
Tabla 4-57. Resultados ANOVA para contenido de fenoles totales en muestras de extractos de cada solvente obtenido con material vegetal	119
Tabla 4-58. Resultados ANOVA para contenido de fenoles totales en muestras de extractos hidroalcohólicos de frutos.....	119
Tabla 4-59. Resumen comparativo de resultados de análisis fisicoquímicos y de caracterización de muestras de reco lección silvestre y muestra de cultivo	121

Tabla de Figuras

Figura 2-1. Producción y acción de la insulina. Adaptado de IDF, atlas de diabetes, 2013.	6
Figura 2-2. Tipos de diabetes. Adaptado de: Atlas de IDF Diabetes Atlas, 2013.	7
Figura 2-3. Prevalencia de diabetes en el mundo. (Adaptado de IDF Diabetes Atlas, 2013).....	9
Figura 2-4. Fotografía de <i>Momordica charantia</i> L.	14
Figura 2-5. Estructuras representativas de los metabolitos secundarios de <i>Momordica charantia</i> L.	18
Figura 3-1. Proceso de obtención de extracto para detección de alcaloides	39
Figura 3-2. Proceso de obtención de extracto para detección de Flavonoides	41
Figura 3-3. Proceso de obtención de extracto para detección de compuestos terpénicos/esteroidales	43
Figura 3-4. Proceso de obtención de extracto para detección de glicósidos cardiotónicos	45
Figura 3-5. Proceso de obtención de extracto para detección de compuestos antracénicos	47
Figura 4-1. Cultivo desarrollado en centro experimental Universidad Nacional sede Palmira CEUNP	55
Figura 4-2. Fotografía de muestras de material vegetal molido	58
Figura 4-3. Fotografía de los frutos secos de las muestras de <i>Momordica charantia</i> L.....	81
Figura 4-4. Estructura nucleo de triterpeno tipo cucurbitano	106

TABLA DE GRÁFICOS

Grafica 4-1. Distribución de tamaño de partícula de las muestras de material vegetal de <i>Momordica charantia</i> L.....	63
Grafica 4-2. Distribución acumulada de tamaño de partícula de las muestras de material vegetal de <i>Momordica charantia</i> L.....	63
Grafico 4-3. Comportamiento del porcentaje humedad residual en función del tiempo.....	64
Gráfico 4-4. Comparación de resultados de material extraíble para las muestras clasificadas por tamaño de partícula en los diferentes solventes	66
Grafico 4-5. Comparación de resultados de material extraíble para las muestras clasificadas por tamaño de partícula en los diferentes solventes	68
Grafica 4-6. Diagramas de cajas de la medida ancho de los frutos antes (a) y después (b) de retirar los valores atípicos	82
Grafica 4-7. Histograma de distribución de las medidas de ancho de los frutos	82
Grafica 4-8. Diagramas de cajas de la medida de longitud de los frutos antes (a) y después (b) de retirar los valores atípicos.....	83
Grafica 4-9. Diagramas de cajas de la medida de longitud de los frutos antes (a) y después (b) de retirar los valores atípicos.....	83
Grafico 4-10. Comparación de resultados de porcentaje de cenizas totales para las muestras de recolección silvestre y de cultivo.....	89
Grafico 4-11. Comparación de resultados de porcentaje de cenizas insolubles en ácido para las muestras de recolección silvestre y de cultivo	90
Grafico 4-12. Contenido de fenoles totales (reportados como mg AG/g extracto) en muestras de extractos de <i>Momordica charantia</i> L.....	116

Lista de Símbolos y Abreviaturas

Listado de Símbolos

Símbolo	Definición	Unidad
µg	Microgramo	Masa
mg	Miligramo	Masa
g	Gramo	Masa
nm	Nanómetro	Longitud
µm	Micrómetro	Longitud
cm	Centímetro	Longitud
km	Kilometro	Longitud
mL	mililitro	Volumen
°C	Centigrado	Temperatura
h	Hora	Tiempo

Listado de Abreviaturas

Abreviatura	Término
UV	Ultravioleta
IE	Índice de espuma
RSD	Relacion droga-solvente
UFC	Unidades formadoras de colonias
CCD	Cromatografía en capa delgada
INVIMA	Instituto Nacional de Vigilancia de medicamentos y alimentos
OMS/WHO	Organización mundial de la salud/ World Health Organization
UFC	Unidad formadora de colonias

1. INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales y preparaciones a base de ellas, ha acompañado al ser humano a lo largo de toda su evolución. Este conocimiento que se ha logrado a través de la observación, y por ensayo y error, se ha transmitido durante diferentes generaciones y hace parte del legado de cada cultura. No obstante los avances de la ciencia y la aparición de fármacos de síntesis química, relegaron durante mucho tiempo el uso de la medicina tradicional, en particular para los países occidentales.

Hace algunas décadas, el incremento de enfermedades crónicas y el reporte de efectos adversos marcados por el uso continuo de medicamentos, el diagnóstico de nuevas enfermedades, el limitado acceso a medicamentos, entre otros aspectos, contribuyeron a que el uso de plantas medicinales y más recientemente de productos fitoterapéuticos se retomara. Tal ha sido la participación en el mercado de estos productos que se reportó entre 1980 y 1995 un crecimiento del 2000% (Sharapin, 2000^b). Dicha tendencia ha estado acompañada de cambios en estilo de la alimentación y hábitos de vida de los consumidores (Fonnegra y Jiménez, 1999).

Sin embargo, a pesar de que el uso se ha masificado rápidamente dando respuesta al mercado con diferentes productos fitoterapéuticos, y se ha empezado a establecer la legislación que regule la comercialización en diferentes países de América latina, se requiere mayor énfasis en formación de profesionales que soporten el campo técnico y asistencial enfocado a atender las necesidades asociadas al desarrollo y uso de estos productos.

En países como Alemania, Francia y Estados Unidos, se ha incrementado el uso de productos fitoterapéuticos en casi el 50% de la población para algunas patologías, sin embargo no son países productores de las materias primas vegetales con que se fabrican, un alto porcentaje son importadas de países en desarrollo de América, India y China (Cañigual et al., 2003).

Brasil es el principal productor de materias primas en sur América y el líder de este campo en la región, lo cual se atribuye al desarrollo de un programa completo que ha involucrado la investigación en agrotecnología, ciencias químicas y farmacología, aplicado a plantas medicinales nativas. Adicionalmente la inclusión de especies vegetales de uso tradicional en su farmacopea, el desarrollo de estudios de accesibilidad de medicamentos a la población, entre otros han logrado una mayor participación en el mercado de materias primas vegetales y productos fitoterapéuticos a nivel mundial (Cañigual et al., 2003).

Es de resaltar que si bien es cierto, los productos fitoterapéuticos representan menores efectos secundarios en la mayoría de los casos, es necesario que sean desarrollados y regulados como cualquier otro medicamento, garantizando los principios de seguridad, eficacia y calidad.

Como parte del desarrollo de estos medicamentos se debe tener en cuenta que la calidad de la materia prima tiene gran impacto sobre la eficacia y la seguridad de los extractos, y de los productos fitoterapéuticos. Al ser una mezcla compleja, no sólo se debe considerar la presencia y cantidad de principios activos sino de otros componentes que pueden modificar la biodisponibilidad, estabilidad o potencia de la acción (Alonso, 2010).

La calidad del material vegetal puede verse afectada por la variabilidad inherente al hecho de provenir de un ser vivo y a su procesamiento; de modo que es necesario definir las condiciones y controlar las operaciones desde el cultivo, garantizando identidad del material, momento y forma de la colecta, tratamiento de secado, almacenamiento y proceso de extracción (Sharapin, 2000^a; Alonso, 2010). La fuente de obtención del material vegetal tiene gran impacto sobre la calidad de la droga y en consecuencia de los productos en que sea utilizada (Luengas-Caicedo et al., 2007).

En Colombia es la escasa investigación sobre su propia biodiversidad. Son pocos los esfuerzos realizados por la integración de la investigación en ciencias farmacéuticas (fitoquímica / farmacotecnia y farmacología) con de las ciencias agronómicas para optimización de condiciones de cultivo, o con otras ciencias, que permitan mejorar la calidad y características de materiales vegetales o extractos. Lo anterior ha limitado el propio abastecimiento de material vegetal en el país y su participación en el

mercado de las exportaciones hacia otros países con altas exigencias en la calidad de las materias primas para elaboración de productos fitoterapéuticos (Alonso, 2010).

Un estudio realizado por el Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt en 2001 evidencia que el 14 % de plantas comercializadas por los laboratorios de productos fitoterapéuticos en Colombia provienen de recolección silvestre, el 39,7% de cultivo, el 16,7% pueden provenir algunas veces de cultivo o colecta silvestre, hay 10,3% de plantas que vienen por importación desconociendo la fuente y para el 20% restante de especies no hay información disponible (Díaz et al., 2003). Lo anterior evidencia la necesidad de masificar la generación de cultivos de plantas medicinales cuando sea posible, para ofrecer a los laboratorios una fuente confiable y sostenible de material vegetal. Es importante mencionar que para la mayoría de las plantas no se tienen reportes de estudios de especies colombianas donde se logre comparar material vegetal obtenido de cultivo, con el proveniente de origen silvestre, que permita utilizar indistintamente cualquiera de ellos, lo cual puede afectar la calidad de los extractos y por ende de los productos.

Con este trabajo se buscó proporcionar información que sirviera como herramienta para control de calidad del material vegetal de la Balsamina (*Momordica charantia* L.), una planta que se encuentra en el Vademécum Colombiano de Plantas Medicinales, indicada para el tratamiento de la diabetes. Actualmente es probable que se venga utilizando el material vegetal proveniente de cultivo y de crecimiento silvestre para la elaboración de productos fitoterapéuticos, sin embargo se desconoce el impacto de la fuente de obtención sobre la calidad de los mismos. De esta manera este trabajo generó información que podría ser empleada por parte de la industria de productos fitoterapéuticos, para el control y mejor aprovechamiento de esta planta medicinal.

OBJETIVOS

Objetivo General

Proponer parámetros de calidad y rangos de variación para el material vegetal de *Momordica charantia* L. proveniente de individuos silvestres y de cultivo, y determinar su influencia en la composición de extractos.

Objetivos Específicos

- Evaluar la variabilidad en los resultados de la caracterización de muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L., obtenido de individuos silvestres y de cultivo.
- Determinar la influencia de algunos parámetros de calidad de la materia prima vegetal en la composición de extractos de *Momordica charantia* L.
- Proponer una monografía preliminar para el control de calidad de materia prima vegetal de *Momordica charantia* L.

2. MARCO TEORICO

2.1 Fitoterapia

El concepto de fitoterapia hace referencia a “terapéutica de la plantas”, es decir ciencia que estudia el uso de productos de origen vegetal para el tratamiento de enfermedades (Cañigual, 2002). Sin embargo, no se limita al uso actual de productos elaborados sino a toda la participación que han tenido las plantas en preparados tradicionales o compuestos activos aislados, que han servido de referencia para síntesis de compuestos activos a lo largo de la historia del hombre.

El uso de las plantas medicinales como herramienta de la terapéutica actual, ha incrementado a medida que lo ha hecho el conocimiento científico que soporta su eficacia. De igual manera ha ocurrido una transición desde el uso de preparaciones caseras hasta la elaboración de productos farmacéuticos con seguridad, calidad y eficacia demostrada y que cumplen con los estándares de los medicamentos convencionales. Tal ha sido el crecimiento, que se creó la necesidad de generar monografías dentro de las farmacopeas y legislación específica, e incluso de armonización entre países para lograr un mayor control de dichos productos. De la misma manera se ha visto reflejado en el aumento del comercio y uso hasta en un 92%, dependiendo de la patología en Europa (Alemania y Francia), Asia y Norteamérica.

Un producto fitoterapéutico, según la legislación colombiana específicamente en el *decreto 2266 de 2004, por el cual se reglamentan los regímenes de registros sanitarios, y de vigilancia y control sanitario y publicidad de los productos fitoterapéuticos*, “Es aquel producto medicinal empacado y etiquetado, cuyas sustancias activas provienen de material de la planta medicinal o asociaciones de estas, presentado en estado bruto o en forma farmacéutica que se utiliza con fines terapéuticos. También puede provenir de extractos, tinturas o aceites. No podrá contener en su formulación principios activos aislados y químicamente definidos. Los productos obtenidos de material de la planta

medicinal que haya sido procesado y obtenido en forma pura no será clasificado como producto fitoterapéutico”.

2.2 Diabetes Mellitus

2.2.1 Patología

La insulina es una hormona que se produce en el páncreas y que permite que la glucosa proveniente de los alimentos, ingrese a las células donde se convierte en la energía necesaria para el funcionamiento de los músculos y tejidos.

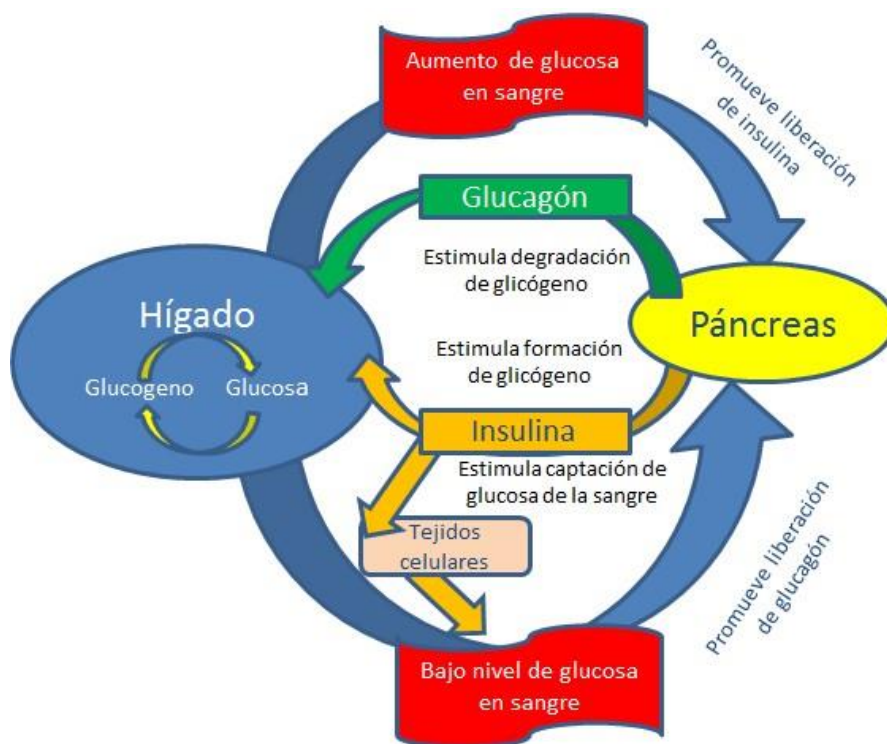


Figura 2-1. Producción y acción de la insulina. Adaptado de IDF, atlas de diabetes, 2013.

La diabetes es una enfermedad crónica caracterizada por alteraciones metabólicas, producto de los altos niveles de glucosa que se generan por afectación en la secreción y/o acción de la insulina, o tras ser secretada, algunas anomalías que afectan su interacción en los tejidos.

Cuando la glucosa no se absorbe adecuadamente, se mantiene en circulación (hiperglicemia crónica) la cual está asociada a daño a largo plazo, disfunción o falla de varios órganos, especialmente ojos, riñones, nervios, corazón y vasos sanguíneos (American Diabetes Association, 2006).

La diabetes puede ser de tres tipos:

- **Diabetes tipo I:** Usualmente es diagnosticada en niños y adultos jóvenes. La causa principal es la deficiencia absoluta de la secreción de insulina. Se genera por la destrucción autoinmune de las células β del páncreas que secretan la hormona.
- **Diabetes tipo II:** es la forma más común de diabetes. La causa es la combinación de la resistencia a la acción de la insulina y falla en la respuesta compensatoria de secreción de la hormona.
- **Diabetes gestacional:** Está definida como cualquier grado de intolerancia a la glucosa al inicio o durante el embarazo. Esta condición se produce debido a un bloqueo en la acción de la insulina probablemente por el efecto de las hormonas producidas en la placenta.

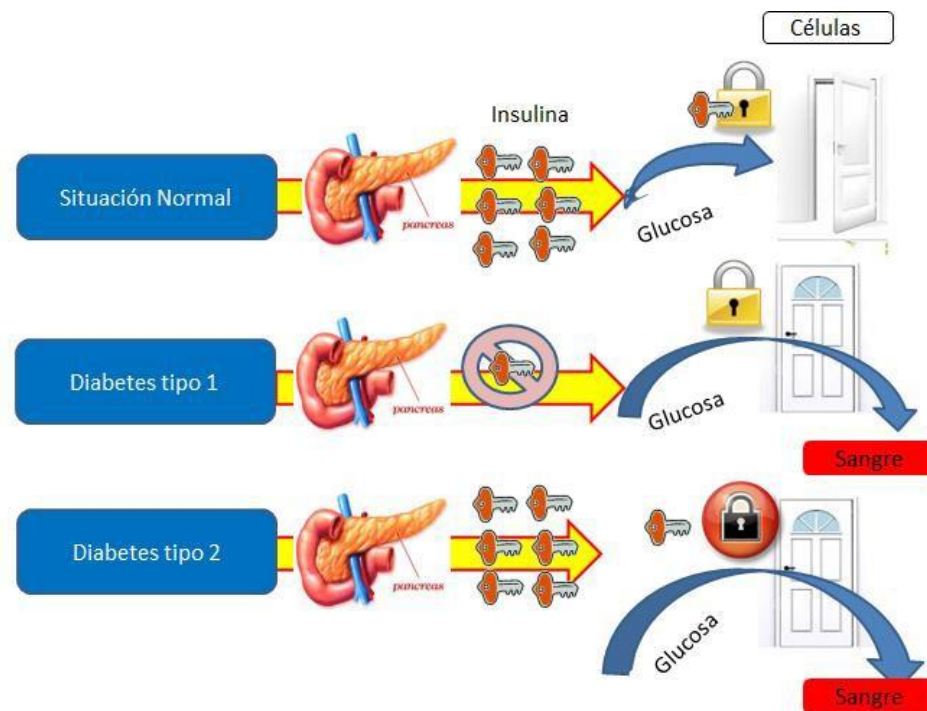


Figura 2-2. Tipos de diabetes. Adaptado de: Atlas de IDF Diabetes Atlas, 2013.

2.2.2. Síntomas

Los síntomas que caracterizan la enfermedad incluyen poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso. Se incrementa la susceptibilidad a infecciones y acetoacidosis. Dentro de las complicaciones a largo plazo están retinopatía y posible pérdida de la visión, nefropatía con falla renal, neuropatía periférica con riesgo de ulceraciones y lesiones que llevan a amputaciones en extremidades, disfunción gastrointestinal, genitourinaria, cardiovascular y sexual (American Diabetes Association, 2006).

2.2.3 Prevalencia de Diabetes

En un estudio reciente (IDF Diabetes atlas, 2013) se encontró que alrededor de 382 millones de personas en el mundo (8,3% de adultos) padecen la enfermedad, de los cuales el 80% viven en países con ingresos bajos-medios y que el 46% de los pacientes no ha sido diagnosticado. Si la tendencia se mantiene, se espera que para el año 2035 la cantidad de personas con diabetes aumente a 592 millones.

La distribución por poblaciones, indica que casi la mitad de los adultos que sufren diabetes están entre 40-59 años y que actualmente existen 1,9 billones de pacientes jóvenes (0-14 años). En cuanto a la diferencia de género, existe una leve diferencia siendo la población masculina más afectada (198 millones de hombres frente a 184 millones de mujeres). De igual manera se observa un aumento en la cantidad de pacientes en zonas urbanas (264 millones) frente a los que viven en áreas rurales (136 millones).

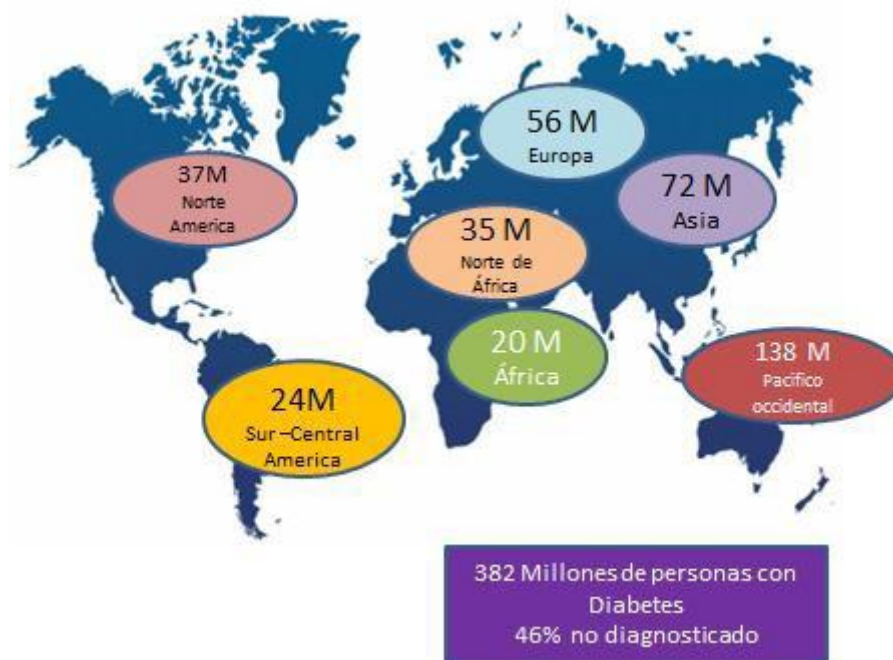


Figura 2-3. Prevalencia de diabetes en el mundo. (Adaptado de IDF Diabetes Atlas, 2013).

Al finalizar el año 2013, la diabetes habrá causado alrededor de 5,1 millones de muertes en pacientes entre 20 y 79 años, que representan un 8,4 % de las causas de mortalidad entre el mismo grupo etario, con un costo de 548 billones de dólares de inversión en salud, que corresponde al 10,8% del presupuesto invertido a este sector.

En la región de América central y del sur todos los países tienen distribuciones en edad similares y con un marcado incremento de afectación en población joven respecto a las otras regiones del mundo. Cerca de 24,1 millones de personas en América (8,0% de la población adulta) padece la enfermedad y se espera que en el año 2035 se incremente en 60%, correspondiente a 38,5 millones.

País	Población 2013	Población afectada (millones)	Población afectada (%)
Brasil	201'032.714	11,9	5,92
Colombia	47'387.109	2,1	4,43
Argentina	42'192.500 ¹	1,6	3,79
Chile	16'634.603	1,3	7,81

1. Estimado de población de 2012.

Tabla 2-1. Población de países de Suramérica afectada con diabetes

Brasil representa el país con la mayor cantidad de personas afectadas por la enfermedad y el mayor índice de mortalidad; sin embargo, Chile es el país con mayor porcentaje de población afectada.

El gasto en salud para la diabetes está estimado en 26,2 billones de dólares, siendo el 13% del presupuesto total (IDF Diabetes Atlas, 2012).

La prevalencia de diabetes tipo II en Colombia es aproximadamente del 7,4% en hombres y del 8,7% en mujeres mayores de 30 años, siendo cuatro veces más frecuente en la población urbana que rural, lo que lleva a pensar que los cambios en el estilo de vida, sedentarismo y la pérdida de hábitos saludables son factores de riesgo para la enfermedad. En un estudio desarrollado durante el año 2007, la diabetes se clasificó como una de las cinco causas de mortalidad en Colombia.

2.2.4 Tratamiento de Diabetes

Dentro del tratamiento farmacológico se encuentra el uso de Sulfoniureas cuyo mecanismo de acción consiste en reforzar la secreción de insulina. Este grupo farmacológico está contraindicado para pacientes con Diabetes Mellitus tipo I, durante embarazo y lactancia, cetoacidosis y en pacientes alérgicos a sulfas. Dentro de sus principales efectos adversos se encuentran la hipoglicemia, dermatosis, discrasias sanguíneas, colestasis, hiponatremia y efecto disulfiram. El fármaco más reconocido de este grupo es la glibenclamida.

Otro grupo farmacológico son las Biguanidas, las cuales reducen el nivel de glucosa plasmática a través de la disminución basal de glucosa hepática y el incremento de la sensibilidad de insulina en el músculo. De igual manera estos fármacos reducen los niveles de triglicéridos y colesterol. Las biguanidas están contraindicadas en pacientes con acidosis láctica, insuficiencia renal, hepática y cardíaca entre otras condiciones. Dentro de los efectos adversos más comunes se encuentran las alteraciones gastrointestinales.

Finalmente se encuentra el grupo de los inhibidores de α -glucosidasa, representados por la Acarbosa la cual tiene el efecto menos potente. Este fármaco logra su efecto a través

de la reducción de glucosa posprandial interfiriendo en la digestión de carbohidratos y el retraso de la absorción de glucosa. Los efectos adversos se relacionan con problemas gastrointestinales.

La insulina es el medicamento más utilizado cuando existe una falla de los medicamentos hipoglicemiantes orales. Se encuentra disponible la insulina de acción rápida, insulina de acción intermedia e insulina lispro (Oviedo et al., 2003).

2.2.5 Fitoterapia para el tratamiento de la diabetes

Existen más de 1200 especies vegetales con potencial hipoglicemiante para el tratamiento de la diabetes de los cuales casi la mitad tiene algún estudio que soporta su actividad y la otra mitad se utiliza sobre la base de información de uso tradicional (Giner y Castillo, 2003).

Las principales clases de metabolitos asociados con relación a la actividad hipoglicemiante son alcaloides, glucopéptidos, terpenos, esteroides, flavonoides y cumarinas entre otros:

Metabolitos/ compuestos		Drogas	Mecanismo	Referencia
Iones inorgánicos	Cromo	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	El cromo actúa sobre la secreción de insulina y absorción de glucosa, además de metabolismo de grasas. Junto con el ácido nicotínico y aminoácidos, forma parte del Factor de Tolerancia de la Glucosa (GTF), que es una proteína que facilita la unión de insulina a receptores celulares y el transporte de glucosa dentro de la célula, normalizando el nivel de glucosa en sangre.	(Riales y Albrink, 1891)
		Pericarpio de <i>Phaseolus vulgaris</i>		(Dilawari et al., 1981) (Khaleeva et al., 1987) (Vanaclocha y Cañigual, 2003)
		Hoja de <i>Vaccinium myrtillus</i> *		(Tomoda et al., 1987.) (Peris et al., 1995) (Cignarella et al., 1996) (Blumenthal, 1998.)
Polisacáridos	Mucilagos	Goma guar- <i>Cyamopsis tetragonolobus</i> L.	Los mucilagos cambian sus características físicas en contacto con al agua, modificando el ambiente del intestino y disminuyendo la velocidad de absorción de carbohidratos. Lo anterior reduce los picos de glicemia y evita la estimulación exógena de la secreción de insulina. También tienen efecto hipocolesterolemia por la formación de complejos y eliminación de las sales biliares.	(Landin et al, 1992)
		Semillas de <i>Plantago sp</i>		(Anderson et al., 1999)
		Semilla de <i>trigonella foenum-graecum</i> L.		Sharma et al., 1990) (Al-Habori y Raman, 1998) (Mada, 1998)

Metabolitos/ compuestos		Fuente natural	Mecanismo	Referencia
	Derivados Glucídicos	<i>Ganoderma lucidum</i> Karst	Actividad atribuida al contenido de polisacáridos	(Hikino et al. 1985) (Hirotsu y Ganoderic, 1986) (Hikino et al.,1989)
Varios componentes		Hoja de <i>Gymnema sylvestre</i>	Se ha atribuido la reducción de glucosa por el contenido de Heterósidos cianogenéticos.	(Kaj-a-Kamb et al., 1992) (Masso y Adzet, 1976)
			Se destaca el contenido de saponinas triterpénicas, fitoesteroles y péptidos. Los extractos de hojas aumentan el número de células beta de los islotes de Langerhans del páncreas, incrementando el nivel de insulina. La actividad hipoglucemiante se atribuye también a la disminución de la absorción de glucosa intestinal y el aumento del transporte intracelular de la misma. El uso de los extractos como tratamiento complementario a la administración de insulina u otros hipoglucemiantes orales, favoreció la producción de insulina endógena y la reducción de dosis de fármaco respectivamente.	(Baskaran et al.,1990). (Okabayashi et al.,1990) (Shanmugasundaram et al., 1990). (Fushiki et al., 1992) (Murakami et al.,1996) (Chattopadhyay,1998) (Persaud et al.,1999) (Fletcher et al.,1999.
		Fruto de <i>Momordica charantia</i> L.	Se atribuye la actividad a 3 tipos de constituyentes: Charantina (mezcla heterosidos de fitoesteroles), péptidos bioactivos (polipeptido P) y alcaloides (momordicina).El jugo del fruto aumenta el número de células beta en el páncreas, incrementando la capacidad celular para captar la glucosa, reduciendo la salida de glucosa del hígado, optimizando el uso de glucosa en tejidos periféricos, disminuyendo la absorción intestinal de glucosa y aumentando la síntesis de glucógeno en los músculos.	(Lolitkar y Rajarama, 1996) (Raman y Lau, 1996) (Welihinda et al., 1986) (Welihinda et al., 1982)
		Raiz de <i>Panax Gingseng</i>	Los principales constituyentes con actividad hipoglucemiante son los panaxanos. Estimulan el uso hepático de glucosa al aumentar la producción de glucosa 6-P deshidrogenasa, fosforilasa A y fosfofructoquinasa. Aumenta la producción de insulina desde los islotes del páncreas y aumenta número de receptores periféricos para mejorar la sensibilidad a la misma.	(Suzuki y Hikino,1989) (Sotaniemi et al.,1995) (Attele et al., 2002) (Naval et al.,2002)

* Comision E del Ministerio de Sanidad Alemán no aprueba sus usos populares para diabetes, gota y artritis.

Tabla 2-2. Plantas utilizadas en fitoterapia para el tratamiento de la diabetes. Adaptado de Giner y Castillo (2003).

Los mecanismos involucrados dentro de la regulación del nivel de glucosa están relacionados con antagonismo directo competitivo con la insulina, estimulación de la secreción de insulina, estimulación de gluconeogénesis y glucolisis hepática, adrenomimetismo, bloqueo de canales de potasio en las células Beta del páncreas, estimulación de AMPc y modulación de la absorción de glucosa desde el intestino.

2.3 *Momordica charantia* L.

2.3.1 Cucurbitáceas

La familia Cucurbitaceae está constituida por 110 géneros y 640 especies que abundan en el trópico con algunas especies semidesérticas. Cuarenta y cinco especies pertenecen al género *Momordica*, con un importante número de especies utilizadas en alimentación humana y animal.

Generalmente son plantas herbáceas y trepadoras que crecen rápidamente. Las flores usualmente son unisexuales y regulares. El fruto es alargado y rugoso, con semillas anchas y planas. Las hojas son alternas, simples, palmeado-lobulada con zarcillos helicoidales. La mayoría de miembros tienen como característica en su estructura haces vasculares bicolaterales.

Se ha reportado la presencia de compuestos cianogenéticos, alcaloides, flavonoides y saponinas (Trease y Evans, 2002).

2.3.2 Género *Momordica*

El género *Momordica* cubre una amplia variedad de plantas silvestres de gran importancia por su funcionalidad en ecosistemas y aplicación en la medicina. De igual manera, incluye la mayoría de vegetales de la familia Cucurbitaceae que se utilizan como alimento (*Momordica charantia* L).

Alrededor de 59 especies comprenden este género, siendo nativas del trópico y distribuidas en su mayoría en África, diez especies en Asia, siete en la India y algunas en sur América. Todas las especies crecen en ambientes cálidos y áreas húmedas, con tierras bien drenadas de pH ligeramente ácido (Bharathi y Joseph, 2013).

2.3.3 Especie *Momordica charantia* L.

Nombre científico: *Momordica charantia* L.

Familia: Cucurbitaceae.

2.3.3.1 Descripción de la planta

Es una planta medicinal nativa de varios países tropicales, incluido Colombia (Instituto Alexander von Humboldt, 2001).

Momordica charantia L. es conocida como karela en India, melón amargo (por el sabor amargo de todas sus partes) o Cundeamor en sur América. En Colombia se reconoce por sus nombres comunes Balsamina, bejuco de coje, subicogen, pepinillo, pepino cimarrón (Vademecum Colombiano de Plantas Medicinales, 2008) y en el Valle del Cauca, como comidita de culebra.

Momordica charantia L. es una planta herbácea anual, tipo enredadera, bastante ramificada con tallo provisto de zarcillos. Las hojas son lobadas (cinco a siete lóbulos de 3-6 cm ovado-oblongos), alternas, membranosas, lisas y aterciopeladas por debajo de la nerviación (Lima, 2008).

Las flores son amarillas, axilares, solitarias, pedunculadas y unisexuales; tiene corola de cinco pétalos acompañadas de una gran bráctea. Su fruto es cilíndrico- alargado de aproximadamente 2-3 cm el cual es verde cuando está creciendo y al madurar adquiere una coloración naranja.



Laura Carlos, 2012, Valle del Cauca

Figura 2-4. Fotografía de *Momordica charantia* L.

Esta planta crece espontáneamente en áreas tropicales y subtropicales de Asia, Amazonas, África y el Caribe, donde también es cultivada.

Ha sido usada tradicionalmente como planta medicinal en países como Brasil, Colombia, Haití, Nicaragua, México, Panamá, Perú, Ghana, India, China, Malasia, Nueva Zelanda y Cuba (Sarkar et al., 1996; Mahdi et al., 2003; Grover y Yadav, 2004; Lagarto et al., 2008; Salomon et al., 2011; Yadav et al., 2010).

En Colombia crece en los departamentos de Tolima, Magdalena, Antioquia, Bolívar, Santander, Cundinamarca, Valle del Cauca, Bolívar, entre otros. En zonas de altitud entre 340 y 1000 m.s.n.m, se han registrado ejemplares en el Herbario Nacional Colombiano.

2.3.3.2 Actividad terapéutica y farmacología

La monografía de OMS para el fruto de *Momordica charantia* L. se reportan estudios que soportan su uso como coadyuvante en el tratamiento de la diabetes y la hipercolesterolemia y como inmunoestimulante. Como usos tradicionales se reporta en el tratamiento de anemia, artritis, fiebre, gota, cálculos renales, úlceras pépticas, dolor de estómago y parásitos (World Health Organization, 2009).

Esta planta se encuentra incluida dentro del Vademécum Colombiano de plantas medicinales, lo cual reduce los requerimientos para comercializar productos que utilicen esta planta. La indicación que se encuentra reportada es coadyuvante en el tratamiento de la diabetes no insulino-dependiente; sin embargo, tiene alrededor de 30 usos dentro de los cuales los más importantes son antidiabético, antiparasitario, emenagogo, antihelmíntico, antirreumático, antihipertensivo, antimalárico, carminativo, colerético, antipirético y antiflatulento. La actividad farmacológica más estudiada es hipoglicemiante (Sarkar et al., 1996; Mahdi et al., 2003; Virdi et al., 2003).

Varios autores han estudiado la actividad terapéutica de *Momordica charantia* L. mediante estudios preclínicos y clínicos, siendo la actividad hipoglicemiante la más estudiada.

Parte de la Planta	Actividad Farmacológica	Tipo de estudio	Descripción	Referencia
Todas las partes (fruto , semillas, hojas)	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Estudios en ratas sin diabetes.	Bailey et al.,1985 Day et al.,1990 Ali et al.,1993 Shibib et al.,1993 Cakici et al.,1994 Sarkar et al.,1996 Jayasooriya et al.,2000
Extractos de todas las partes de la planta. (fruto ,semillas, hojas).	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Estudio en ratas y ratones con diabetes inducida por Aloxano	Sharma et al.,1960 Akhtar, 1982 Karunanayake et al., 1984 Singh et al.,1989 Pari et al.,2001 Rathi et al.,2002 Kar et al.,2003 Virdi et al.,2003
Extractos de todas las partes de la planta. (fruto , semillas, hojas).	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Estudio en ratas, conejos y ratones con diabetes inducida por Estreptozotocina	Kedar and Chakrabarti,1982 Bailey et al.,1985 Day et al.,1990 Karunanayake et al.,1990 Higashino et al.,1992 Shibib et al.,1993 Sarkar et al.,1996 Ahmed et al.,1998 Sitasawad et al.,2000 Ahmed et al.,2001 Grover et al.,2002 Rathi et al.,2002
Extracto del fruto en agua	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Ensayo clínico con nueve pacientes Diabéticos	Leatherdale et al., 1981
Suspensión de la pulpa del fruto	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Ensayo clínico con 100 pacientes diabéticos.	Ahmad et al., 1999
Inyección subcutánea de proteína p-insulina pura	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Ensayo clínico controlado a nueve pacientes diabéticos no insulino dependientes (seis pacientes con diabetes infantil, uno con al inicio de la madurez y dos con diabetes química)	Baldwa et al., 1976.
Inyección subcutánea de polipéptido-P	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Ensayo clínico con 19 pacientes diabéticos menores y adultos.	Khanna et al., 1981
Extracto de hojas en agua, metanol y etanol)	Actividad antibacterial	Ensayo de laboratorio	Evaluada frente <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> , <i>Shigella dysenterae</i> y <i>Streptomyces Griseus</i>	Omogegbe et al., 1996 Ogata et al., 1991.
Extracto de la planta entera	Actividad antiparasitaria	Ensayo de laboratorio	Evaluada frente a <i>Entamoeba Histolytica</i>	Khan et al., 1998
Extracto de la planta entera	Actividad antimicrobiana	Ensayo de laboratorio	Evaluada frente a <i>Helicobacter pylori</i> . Se determinó la (CMI) Concentración mínima inhibitoria	Yesilada et al., 1999
Extracto de hojas	Antimicrobiana	Ensayo de laboratorio	Evaluación frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizando el método de análisis de susceptibilidad a través del sistema BACTED 460	Frame et al., 1998
Extracto crudo y fracciones purificadas	Actividad anticancerígena	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	Evaluado contra leucemia linfocítica, linfoma, coriocarcinoma, melanoma, cáncer de mama, tumores de la piel, cáncer de próstata, lengua, laringe y linfoma de Hodgkin	Licastro et al.,1980 Ng et al., 1994 Battelli et al.,1996 Ganguly et al.,2000 Sun et al.,2001

Parte de la Planta	Actividad Farmacológica	Tipo de estudio	Descripción	Referencia
Fracción rica en saponinas de Extracto etanólico y saponinas purificadas	Actividad antidiabética	<i>In vitro</i>	Evaluated por medición de la secreción de insulina en células β incubadas con el extracto	Keller et al., 2011 ^a
Extractos de frutos en agua, etanol, metanol cloriformo y hexano	Actividad hipoglicemiante	<i>In vitro</i>	Estudio con ratas no diabéticas. Se induce hiperglicemia con administración de glucosa. Se evaluó el efecto de los extractos de forma independiente y en uso concomitante con Glimepirida.	Yadav, 2010
Extractos y fracciones de hojas	Actividad Antibacterial	Ensayo de laboratorio	Evaluación de actividad antimicrobiana <i>S. Aureus</i> , <i>B. Cereus</i> , <i>E. Coli</i> .	Costa, 2011

Tabla 2-3. Estudios clínicos y preclínicos para evaluación de actividad farmacológica de *Momordica charantia* L. Adaptado de (Grover, 2004).

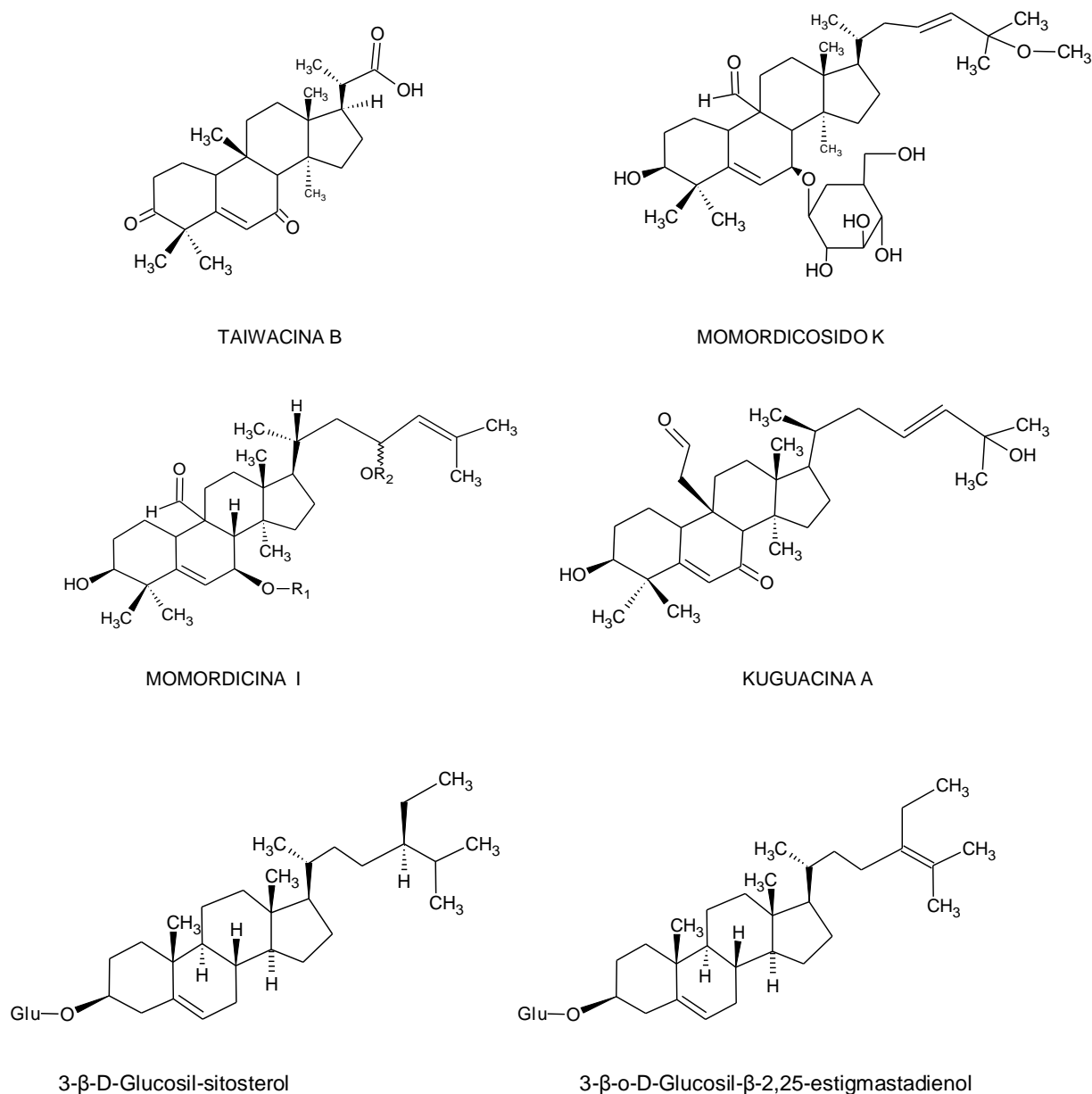
2.3.3.3 Composición

A través de estudios fitoquímicos, algunos autores han reportado en general compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides), glicósidos triterpénicos, saponinas, glicósidos esteroidales y una fracción de alcaloides no caracterizados. Adicionalmente se reportó la presencia de Momordicosidos (A, B, C, D, E, F1, F2, G, I, K, L Q), Momordicinas (I, II y III) y proteínas (Raman y Lau, 1996).

En raíces específicamente, se han aislado algunos compuestos triterpénicos conocidos como Kuguacinas A - E (Chen et al., 2008), mientras que en partes aéreas se han reportado Kuguacina F-S y charantal.

En los frutos se han identificado triterpenos como taiwacinas, alcaloides, fenoles, taninos, saponinas, además de terpenoides cucurbitanos, responsables de la actividad (Yadav et al., 2010). La monografía de OMS (2009) reporta adicionalmente Goyaglicosidos A - H y Goyasaponinas I - III.

A continuación se relacionan algunas estructuras químicas representativas de compuestos reportados para la planta, y en el *Anexo 7-1 se puede* evidenciar un consolidado más amplio.



COMPONENTES DE CHARANTINA

Figura 2-5. Estructuras representativas de los metabolitos secundarios de *Momordica charantia* L.

2.3.3.4 Toxicidad y Reacciones Adversas

La ingesta de todas las partes aéreas de la planta reporta baja toxicidad. En cuanto al consumo del fruto, no manifestó signos de nefrotoxicidad ni hepatotoxicidad en animales cuando fué administrado en dosis bajas por menos de dos meses. Sin embargo se evidencia

en algunos estudios que tanto el fruto como las semillas tienen mayor toxicidad que las demás partes aéreas. En cuanto a los extractos, se ha documentado que tras la administración intraperitoneal o intravenosa de extractos de la planta existe evidencia de alta toxicidad e incluso la muerte (Grover, 2004).

Según lo reportado en un estudio (Lagarto et al., 2008) los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Momordica charantia* L. se ensayaron en ratas para evaluar toxicidad aguda oral e irritación dérmica y ocular. Se administró una dosis de 2000 mg de extracto por cada kilogramo de peso mediante un régimen de dosificación con previo ayuno. Al finalizar el estudio no se observó la muerte de los animales, ni alteración de los órganos o tejidos analizados. La prueba de irritación dérmica indicó que no hubo alteraciones en la piel de los animales y se clasificaron los extractos como no irritantes. En pruebas de irritación ocular no se produjeron alteraciones en iris, ni conjuntiva, pero si se generaron lesiones en la córnea, que desaparecieron con el tiempo. Los extractos se clasificaron como no irritantes.

Dos estudios diferentes reportan DL_{50} de extractos hidroalcohólicos de partes aéreas por administración intraperitoneal en ratones, uno mayor a 1000 mg/kg y el otro igual a 681 mg/kg.

La DL_{50} de extractos hidroalcohólicos de fruto fue de 681 mg/kg, luego de administración por vía intraperitoneal en ratones. Los extractos acuosos de semilla, administrados por vía intraperitoneal a ratas evidenciaron una DL_{50} de 25 mg/kg (Taylor, 2002).

A continuación se relacionan algunos estudios diseñados para evaluar los efectos adversos tras la administración del extracto en animales:

Evaluación	Parte de la planta	Descripción	Resultado	Referencia
Hepatotoxicidad	Jugo de la planta y extracto de semillas	Administración diaria 10ml/kg de peso por 30 días en ratas	No se observó elevación de las enzimas hepáticas ni defectos histológicos.	Tennekoon et al., 1994.
Efecto abortivo	Extracto hidroetanólico de partes aéreas	Administración por vía oral a ratas preñadas a dosis de 100 mg/kg	Inactivo	Taylor, 2002
Efecto embriotóxico	Extractos acuosos de hojas	Administración por vía oral a ratas a dosis de 200 mg/kg y 500 mg/kg	Inactivo	Taylor, 2002
Toxicidad del jugo de la planta	Jugo de la planta	Administración oral una o dos veces al día de jugo de la planta 6ml/kg de peso a 6 conejos	5 animales murieron entre 5 - 25 días.	Sharma et al., 1960.

Toxicidad del jugo de la planta	Jugo de la planta	Ratas preñadas a quienes se les administró oralmente 6ml/kg de peso	Muerte de las ratas pocas horas después de la administración	Zhang, 1992
Toxicidad del jugo de la planta	Jugo de la planta	Ratas con diabetes inducida con aloxano a quienes se les administró oralmente 6ml/kg de peso.	80-90% de las ratas murieron entre 5 y 23 días.	Zhang, 1992

Tabla 2-4. Estudios de seguridad y toxicidad de extractos de *Momordica charantia* L.

Es importante mencionar que dentro del listado de plantas tóxicas del INVIMA de la sala especializada de productos naturales, actualizado en octubre de 2013 (establecido en el acta 09 de 2012 numeral 3.3) se encuentran incluídos los frutos verdes (inmaduros) y las semillas por su potencial tóxico, atribuido a algunos triterpenoides cucurbitanos (momordicosidos y momordicinas) y lectinas (momodina). Se reporta la dosis letal del jugo LD50: 9 mg/kg y del extracto alcoholico 36 mg/kg.

Toxicidad en Humanos

La toxicidad en humanos no ha sido ampliamente estudiada, sin embargo, se ha reportado que con la administración oral en adultos de 50 mL del jugo no hay efectos adversos ni fatales. La administración de jugo del fruto o extracto seco (equivalente a 250-500 g del fruto) en pacientes diabéticos, condujo a dolor abdominal y diarrea (Raman y Lau, 1996). Se ha referido que el consumo de la decocción del fruto por vía oral en cantidades equivalentes a 500 mg por persona no evidenció signos de toxicidad, sin embargo se relata la inhibición del desarrollo fetal luego de su administración de extracto acuoso de la planta entera a mujeres embarazadas, en dosis de 15 mL/pesona/día (Yukes y Balick, 2010).

Se ha reportado el riesgo de potencial reacción fatal en humanos, evidenciada en un coma hipoglicémico, en niños que ingirieron extracto acuoso de las hojas y partes aéreas de *Momordica charantia* L. Los menores presentaron convulsiones dos horas después de su administración en ayuno, sin embargo se recuperaron tras un tratamiento médico (Hulin, et al.,1988; Basch et al., 2003).

Según la monografía OMS para frutos de *Momordica*, a pesar que se han realizado estudios clínicos de actividad y toxicidad, no existen ensayos aleatorios ni ciegos, y los que se encuentran disponibles, no han sido desarrollados de forma sistemática. Por lo anterior es necesario desarrollar estudios ciegos, controlados mediante un placebo, que permitan un

mayor soporte en la evaluación de seguridad y eficacia.

2.3.3.5 Requerimientos agrotecnológicos

Existen registros de buen crecimiento de la planta a temperatura ambiental alrededor de 24-28°C. La temperatura del suelo para esta condición ambiental es de 28-32°C, la cual mejora el desarrollo de la planta; a temperaturas inferiores a lo reportado, se limita el crecimiento o puede morir. El crecimiento y concentración de metabolitos secundarios se beneficia con exposición a la luz de sol (Félix y Coronel, 2010).

La humedad del suelo puede estar dada por las lluvias o por el riego. Sin embargo, la humedad excesiva puede favorecer el ataque de microorganismos, impedir la germinación de las semillas, desarrollo de raíces, o afectar el suministro de oxígeno. Se ha reportado buen desempeño en humedad relativa de 85-90%.

Respecto al suelo, se precisa el equilibrio de nutrientes siendo los más importantes Nitrógeno (N), Fosforo (P) y Potasio (K) para el desarrollo metabólico óptimo. La acidez del suelo con pH 6.1 ha mostrado buen rendimiento del cultivo (Félix y Coronel, 2010).

2.3.3.6 Factores que afectan la calidad del material vegetal

- **Fuente de obtención**

Las plantas medicinales que crecen espontáneamente y son colectadas por extractivismo, presentan algunas desventajas en cuanto a la reproducibilidad en la composición, la homogeneidad del material vegetal, riesgo de adulteraciones, la posible explotación indiscriminada de especies y disponibilidad del material sujeto a demanda del mercado (Sharapin, 2000^b). Cabe resaltar, que en algunos casos se adopta el extractivismo como alternativa, cuando la planta crece lentamente (más de cinco años de crecimiento para la cosecha), tiene dificultades en la domesticación, por ejemplo por relaciones simbióticas con otras plantas, o es de poca demanda, por lo que resulta más económica la recolección, que el desarrollo de un cultivo (Sharapin, 2000^b; Harnischfeger, 2005).

Se opta por un cultivo, cuando las plantas de crecimiento espontáneo no son accequibles

por su ubicación geográfica, se encuentran ampliamente distribuidas, se desea una variedad específicamente por el alto contenido de un grupo de constituyentes, o se busca mejores rendimientos. A través de la introducción de buenas prácticas agrícolas y el estudio de condiciones agrotecnológicas de un cultivo, se podría garantizar la producción de forma sostenible, reproducible y uniforme de una planta con actividad terapéutica bajo un mayor control (Sharapin, 2000^b; Harnischfeger, 2005).

- **Recolección**

La recolección puede tener impacto en la calidad del material, por lo cual se debe tener en cuenta la época en que se colecta buscando que sea la más favorable en términos del contenido de metabolitos secundarios de interés. De igual manera durante la recolección es importante definir los órganos de interés y evitar la contaminación con otras plantas.

- **Almacenamiento y procesamiento**

El manejo del material y su tratamiento para la conservación después de la recolección, tiene un gran impacto en la estabilidad, seguridad y eficacia del mismo. Durante procesos de selección, secado y almacenamiento, la droga podría verse expuesta a contaminantes físicos externos, ataque microbiológico, degradación enzimática y fotolítica, que podrían afectar la calidad del material. Por lo tanto, se debe conocer claramente los factores de riesgo y condiciones a evitar para la droga y, con base en esto definir los métodos para el tratamiento poscosecha más adecuados para el material que causen el menor deterioro del material (Sharapin, 2000^b).

2.3.3.7 Extracción

Respecto a la extracción, se ha investigado la obtención de extractos a partir de frutos inmaduros secos, por maceración en metanol con agitación a temperatura de 50°C (relación droga : solvente (RDS) 1:10), cloroformo con agitación a 50°C (RDS 1:10) y agua con agitación a temperatura ambiente (RDS 10:25), siendo el extracto acuoso el de mayor eficacia en ratas (dosis de extracto seco 20 mg/kg de peso) comparable a glibenclamida (0,1 mg/kg de peso), sin causar hepatotoxicidad o nefrotoxicidad por administración durante 4 semanas (Virdi et al., 2003).

(Pitipanapong et al., 2007) realizaron la comparación de extractos obtenidos por Soxhlet y extracción líquida presurizada (PLE), evaluando la concentración de charantina. La PLE representó mayor eficiencia de extracción en cuanto a tiempo y consumo de solventes. Se evaluó la influencia de diferentes condiciones de extracción de hojas de *Momordica charantia* L., tales como tipo de método, solvente y relación droga:solvente, sobre el contenido total de flavonoides. Se encontró que la maceración fué el método más eficiente y con mejor rendimiento (Nobre et al., 2005).

Un estudio realizado en Cuba por el CIDEM (Salomon, 2011) reportó la evaluación de la influencia de los parámetros de relación droga: solvente y tiempo de extracción de un proceso de digestión dinámica, sobre el contenido de sólidos totales para un extracto acuoso, a través de un diseño factorial.

Es importante mencionar que de estos estudios, ninguno evalúa ni establece los parámetros para la elaboración de una monografía de control de calidad, ni se definen los aspectos relacionados con la calidad del material vegetal.

2.4 Control de calidad y Monografías

Teniendo en cuenta que son escasos los estudios para demostrar seguridad y eficacia de las plantas medicinales y sus preparaciones, que se ha empezado a establecer la regulación en algunos países definiendo lineamientos mínimos para controlar tanto la materia prima como los productos, es necesario apoyar estos esfuerzos con guías de control, que faciliten la adopción y cumplimiento de la legislación. Las monografías que se han desarrollado tienen como objetivo proveer información científica para facilitar el uso responsable de las plantas medicinales, promover la actualización de profesionales de la salud y entidades regulatorias en cuanto a la información de calidad, seguridad y eficacia disponible para el control de las mismas y servir como herramienta de referencia para la industria.

Existen diferentes de monografías emitidas por asociaciones donde participan equipos multidisciplinarios de la comunidad científica con enfoques hacia el control de calidad del material vegetal tal como se expone en las monografías farmacopéicas. Por otra parte existen las monografías con enfoque en la actividad terapéutica y recopilación de

información de estudios clínicos como son las monografías ESCOP y Comisión E; finalmente se encuentran monografías mixtas donde se presenta un sólido compendio de toda la información analítica y terapéutica, tales como las de la OMS.

Monografía	Tipo de Monografía	Aspectos que incluye
ESCOP	Seguridad y eficacia	Denominación latina e inglesa Definición Principales constituyentes Indicaciones terapéuticas Posología Forma de administración Precauciones Interacciones Efectos sobre el embarazo-lactancia. Efectos secundarios-sobredosificación Propiedades farmacodinámicas y farmacocinéticas Datos preclínicos de seguridad y ensayos clínicos.
Monografías de la Comisión E Alemana	Seguridad y eficacia	Usos clínicos demostrados Contraindicaciones Efectos secundarios Interacciones Índice terapéutico Información para prescripción.
Monografías OMS	Mixta Control de calidad Seguridad Eficacia	Identificación Aspectos botánicos Test de identificación Pureza Análisis químico Principales constituyentes Usos tradicionales no demostrados Experimentación farmacológica y clínica Contraindicaciones Precauciones Efectos secundarios Posología
Farmacopea Herbal Americana	Mixta Control de calidad Seguridad Eficacia	NOMENCLATURA Nombre botánico-Familia Descripción Nombres comunes HISTORIA IDENTIFICACIÓN Identificación botánica Identificación macroscópica Identificación microscópica FUENTE COMERCIAL Y MANIPULACIÓN (colecta, cultivo, secado, manejo y almacenamiento, adulteración, preparaciones). COMPONENTES ACTIVOS ANALÍTICA Análisis de laboratorio Identificación

Monografía	Tipo de Monografía	Aspectos que incluye
		Valoración TLC y HPTLC HPLC Estándares cualitativos/ cuantitativos (humedad, cenizas, microbiología) TERAPÉUTICA Farmacocinética Farmacodinamia Actividad terapéutica Estudios clínicos en humanos Estudios en animales-estudios in vitro Indicaciones Dosificación PERFIL DE SEGURIDAD (CLASIFICACIÓN) Efectos adversos Contraindicaciones Interacciones Efecto en embarazo, mutagenicidad y toxicidad reproductiva-lactancia Carcinogenicidad Precauciones Sobredosificación Toxicología Estatus internacional (regulación en países) Referencias.
Monografías Farmacopea Brasileira	Control de calidad Farmacopéica	Nombre científico Concentración de marcadores Características organolépticas Descripción macroscópica de la planta Descripción microscópica de tejidos Descripción microscópica de del polvo Identificación por TLC Ensayos de pureza (humedad, cenizas, material extraño) Cuantificación Condiciones de almacenamiento.
Monografía Farmacopea Europea	Control de calidad Farmacopéica	Definición contenido Producción Características Identificación macroscópica Identificación microscópica Perfil cromatográfico (TLC/HPTLC, HPLC, CG) Análisis Material Extraño, pérdida por secado, cenizas, material extraíble, Adulterantes, constantes físicas, solventes residuales, alcohol) Otros Cuantificación de marcadores Conservación Posibles contaminantes (metales pesados, pesticidas, contaminación microbiana, toxinas)

Tabla 2-5. Monografías de referencia para drogas vegetales.

Actualmente se encuentra disponible la monografía OMS para frutos secos o frescos de *Momordica charantia* L. (OMS, 2009).

2.5 Legislación Colombiana

Según el decreto 2266 de 2004 “ Por el cual se reglamentan los regímenes de registros sanitarios, y de vigilancia y control sanitario y publicidad de los productos fitoterapéuticos, se define como material de la planta medicinal “es la planta entera, fresca, o desecada incluyendo talofitas, especialmente líquenes, hongos superiores y algas, partes o productos de dicha planta, también se consideren ciertos exudados que no han sometidos a un tratamiento específico, que no generan riesgos para la salud el medio ambiente y que se utiliza para la elaboración de productos fitoterapéuticos. A dicho material se le han atribuido y comprobado actividad terapéutica mediante el conocimiento tradicional, estudios científicos, literatura científica o evaluación clínica”.

De acuerdo a la modificación reglamentada con el decreto 3553 de 2004 por el cual se modifica el Decreto 2266 de 2004 y se dictan otras disposiciones, para materias primas de origen natural, se definen los siguientes controles de calidad:

Clasificación de análisis	Descripción de análisis
Ensayos físicos	Características organolépticas
	Características macroscópicas
	Características microscópicas (cuando aplique)
	Porcentaje de materias extrañas
	Pérdida por secado
	Límite de Metales pesados
Ensayos químicos	Perfil cromatográfico o análisis fitoquímicos
	Los ensayos descritos en la farmacopea (si existe)
Ensayos microbiológicos	Conforme a lo establecido en el documento “Métodos de control de calidad para materiales de plantas medicinales” de la Organización Mundial de la Salud.
	Recuento de hongos y levaduras
	Número mas probable de coliformes fecales < 3 /g
	Microorganismos patógenos

Tabla 2-6. Controles de calidad para materias de origen natural según Decreto 3553 de 2004

2.5.1 Productos registrados en Colombia que utilizan droga de *Momordica charantia* L.

A la fecha 15 de febrero de 2014, el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos - INVIMA, tenía tres productos registrados dentro de su base de datos de registros sanitarios para productos fitoterapéuticos y ocho productos homeopáticos:

Fitoterapéuticos			
Ingrediente activo	Nombre	Registro	Tipo de registro
Extracto 1:1 de hojas de Balsamina (<i>Momordica charantia</i> L.) en alcohol del 36%).	Balsamina tabletas	PFM2010-0001655	Fabricar y vender
Planta pulverizada de Balsamina	GLUNAT solución oral Balsamina	N2006-0000390	Fabricar y vender
Extracto 1:1 de hojas de balsamina (<i>Momordica charantia</i> L.) en alcohol del 36%).	GLUNAT CAPSULAS	INVIMA 2004N-0000216	Fabricar y vender
Homeopáticos			
Principio activo	Nombre	Registro	Tipo de registro
Momordica balsamina D6	Heel 117 Inyectable	MH2008-0000867	Importar y vender
Momordica balsamina 8X	OHM Pancreatic terrain/OHM Terreno pancreático	MH 2012-0001895	Importar y vender
Momordica Balsamina D3	Guna 21	MH2010-0001586	Importar y vender
Momordica Balsamina D4	DR RECKEWEG R72	MH2007-0000661	Importar y vender
Momordica Balsamina D6	Mucsan ®	MH2010-0001438	Fabricar y vender
Momordica Balsamina D6	Mucsan ®	MH2010-0001485	Fabricar y vender
Momordica Balsamina D6	Heel 118 inyectable	MH2009-0001139	Importar y vender
Momordica Balsamina D6	Muko Complex gotas	MH2009-0001342	Fabricar y vender

Tabla 2-7. Productos fitoterapéuticos y homeopáticos registrados en Colombia ante la entidad regulatoria INVIMA

3.METODOLOGÍA

3.1 Listado de equipos

- Balanza de humedad
- Balanza OHAUS triple beam balance 2610 g- 5lb 700 series US PAT N° 2729459
- Balanza Mettler Zurich type H15 capacidad 160 g
- Balanza Sartorius BP 310S Serie 41106595 capacidad max 300 g.
- Balanza de plato externo. Marca Pioneer. OHAUS. Capacidad 3100 g. Sensibilidad 0.01 g
- Baño de agua termostático Memmert
- Estufa Memmert
- BIORAD X Nork Microplate spectrophotometer
- Centrífuga
- Incubadoras 25°C y 40°C
- Lámpara UV UVP Inc. 254nm/365nm/wht light Chromato-VUE C70G UV Viewing system
- Liofilizador Labconco Freeze Dry/ shell Freeze system 12 litros
- Mezclador stomacher 400
- Microscopio Biotech instruments type 102M con lentes 4x ,10x, y 40 x.
- Mufla Furnace 48000 Termolyne
- Rotavapor Buchler instruments
- Tamizador MLW Thyr2 Sieve machine.

3.2 Listado de materiales y reactivos

- Reactivos**

Reactivo	Marca	Lote
Ácido clorhídrico 37%	EM	HX0603-3
Ácido sulfúrico 95-97%	Merck	K30458031.211
Yoduro de potasio 99,5%	Carlo Erba	8G225913M
Acido nítrico 65,9%	JF Baker	9621-02
Nitrato de bismuto	Merck	K33288578444
Cloruro de Mercurio (II)	Fisher	
Yoduro de Mercurio (II) rojo	Merck	1181932
Sal de Reinecke	Merck	51166
Nitrato de Bismuto (III) básico	Merck	1130422
Ácido acético glacial 96%	Merck	511Z96962
Hidróxido de potasio	Carlo Erba	IF055121L
Acetato básico de plomo	Carlo Erba	346901
Hidróxido de sodio	Carlo Erba	9M13421OD
Etanol absoluto	Merck	K40470083/944
Cloruro férrico	Mallinckrodt	5029
Cloroformo	Mallinckrodt	B271309
Metanol	JF Baker	B30C58
Dietilamina	Carlo Erba	0488M100
Tolueno	Merck	K16333725
Acetato de etilo	Mallinckrodt	4992C02D56
Hidróxido de amonio	Fisher Scientific	746133
Ácido fórmico	Baker analyzed	9711110044
Eter de petróleo	Panreac	2109C
Óxido de magnesio	Merck	TA823065
Citrato de sodio USP	Central scientific company	
Potasio dihidrógeno fosfato	Panreac	129817871
Reactivo de Folin-Ciocalteu 2N	Aldrich	Lote 65296 CM

- Estándares para cromatografía en capa delgada y pruebas cualitativas**

Lupeol, rutina y quercetina purificados previamente en el grupo de investigación “Principios Bioactivos en Plantas Medicinales”.

Ácido gálico sigma lote 4740134 G7384 EECN°205749-9

- Materiales**

Material de vidrio Elementos del laboratorio

Vacutainer buffered cit Na (9NC) 0,105M

Bolsas BAG 41 cpg standard bag 50

Cromatofolios Merck TLC Silica gel 60F 254 lote HX949810

3.3 Obtención del material vegetal

Las muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L. de crecimiento silvestre, fueron colectadas en el departamento del Valle del Cauca (Colombia), en las coordenadas geográficas 3°31'48" de latitud norte y 76°81'13" de longitud al oeste de Greenwich. Proviene de un terreno ubicado en el km 13 vía Yumbo – aeropuerto en el municipio de Palmira, corregimiento Matapalo. Se realizó un ejemplar de la planta incluyendo todos los órganos de la misma, el cual fue enviado al Herbario Nacional Colombiano para identificación botánica.

La muestra de cultivo fue obtenida del Centro Experimental de la Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira (CEUNP) con un área de 17.28 hectáreas, ubicado en el punto de coordenadas 3° 24' N y 76° 26' W, Callejón San José, Corregimiento de El Carmelo, municipio de Candelaria en el departamento del Valle del Cauca, a 10 Km del puente de Juanchito en Cali y 28 Km de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de Palmira. Se encuentra a una altitud 1.000 m.s.n.m y con zona climática cálido-moderada.

3.3.1 Colecta

El material vegetal de las muestras silvestres y de cultivo se colectó teniendo como referencia el estado de maduración de los frutos con base en su coloración naranja, lo cual permitió controlar el estado de desarrollo de la planta siendo igual para todas las muestras. Se colectaron las partes aéreas de la planta (hojas, tallos, flores y frutos), y se almacenaron en bolsas de papel Kraft para protección de la humedad de las muestras hasta el proceso de secado.

Las muestras de crecimiento silvestre fueron colectadas de la misma zona en épocas lluviosa y seca, representadas en los meses de recolección agosto de 2012 y enero del 2013, respectivamente. La muestra del cultivo se obtuvo a través de una poda realizada en diciembre de 2012 que correspondía a época seca.

La información de identificación de las muestras se encuentra resumida en la Tabla 3-1.

UBICACIÓN	COLECTA	EPOCA DE COLECTA	CÓDIGO MUESTRA
Palmira , Valle del Cauca	Crecimiento silvestre	Agosto 2012 Lluviosa	S-LI
Candelaria, Valle del Cauca	Cultivo	Diciembre 2012 Seca	C-Se
Palmira , Valle del Cauca	Crecimiento silvestre	Enero 2013 Seca	S-Se

Tabla 3-1. Identificación de las muestras de recolección silvestre y de cultivo utilizadas para el estudio

3.3.2 Secado

Para cada muestra posterior a la colecta se separó el material vegetal en mal estado y material extraño (partes de otras plantas, insectos, residuos de tierra), se fragmentó para ser distribuido uniformemente y favorecer la pérdida de humedad.

El material vegetal fue sometido al proceso de secado realizando el seguimiento mediante la determinación de humedad hasta un valor remanente inferior al 10%. Posteriormente, el material seco se almacenó en bolsas de papel Kraft, protegido de la luz. Es importante aclarar, que a pesar de intentar realizar el proceso de secado similar para todas las muestras en estufa con aire circulante a temperatura $40^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, en todos los casos no hubo disponibilidad del equipo después de la colecta, por lo que se utilizó para cada muestra un proceso de secado diferente, relacionados en la Tabla 3-2.

Muestra	Proceso de secado
S-LI	Secado al aire libre sobre plástico
C-Se	Secado por irradiación en horno artesanal
S-Se	Secado en estufa con aire circulante a 40°C

Tabla 3-2. Condición de secado de las muestras de *Momordica charantia* L.

3.3.3 Molienda

El material vegetal se preservó entero y solo fue sometido al proceso de molienda previo al uso en los ensayos. Se utilizó un molino de cuchillas para fragmentar el material y fue registrado el tiempo de la molienda requerido para trituración de los órganos más rígidos hasta obtención de un material aparentemente homogéneo entre hojas y tallos.

3.4 Descripción física del material

Se realizó una descripción organoléptica del material entero fresco, entero seco y molido de cada una de las muestras tomando como referencia las guías de análisis de OMS (WHO, 2011). Se tomaron los frutos de cada muestra y se realizó la medida de los mismos.

3.5 Análisis de tamaño de partícula

Se determinó la distribución de tamaño de partícula del material vegetal después que ser sometido a un proceso de molienda. Se tomaron aproximadamente 30 gramos de material vegetal molido y se adicionaron sobre la batería de tamices con tamaño de apertura nominal 1000 µm, 590 µm, 380 µm, 250 µm, 150 µm y colector. Se sometió a vibración durante 15 minutos en nivel de intensidad 6 en tamizador MLW THYR 2 Sieve machine. El material remanente de cada tamiz se pesó cuidadosamente en una balanza con precisión 0,1 g y se reportó el material remanente como porcentaje respecto a la cantidad total tamizada. El análisis se realizó para cada muestra por triplicado.

3.6 Análisis de humedad

Se tomó aproximadamente 1 g de material vegetal de cada muestra en una cápsula de porcelana previamente tarada a 105°C ± 5°C en estufa Memmert. Se registró el peso de la cápsula y se introdujo durante una hora en la estufa. Posteriormente se colocó en un desecador durante 15 minutos y se determinó el peso. Se repitió este proceso hasta que no se presentó una variación mayor a 5 mg entre la medida de peso y la anterior. Cada análisis se realizó por triplicado.

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_{cmv} - P_{cv})}{(P_{mv})} * 100$$

P_{cmv}= peso de cápsula con material vegetal después de proceso de secado

P_{cv}= peso de la cápsula vacía

P_{mv}= peso del material vegetal inicial

3.7 Material Extraíble

Se utilizó la metodología de extracción en frío sugerida por las guías de control de calidad de OMS, *Quality control methods for herbal material* 2011.

Se pesaron alrededor de 4 g de material vegetal de tamaño de partícula grueso (>380 µm) y fino (<380 µm) y se colocaron en un Erlenmeyer. Se adicionaron 100 mL de solvente (agua, mezcla agua:etanol 96% (50:50) o etanol 96%) y se dejó en maceración durante 6 horas con agitación frecuente. Cada Erlenmeyer permaneció en reposo durante 18 horas protegido de la luz y posteriormente se filtró sin perder solvente. 25 mL de filtrado se transfirieron a una cápsula de porcelana tarada y se evaporó a sequedad. Se colocó posteriormente cada cápsula en estufa durante 6 horas y finalmente se transfirió a un desecador por 30 minutos registrando el peso después del enfriamiento.

$$\text{Material Extraíble} \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{(Pce - Pcv) * 4}{Pmv (g)}$$

Pce: peso de cápsula con extracto

Pcv: peso de la cápsula vacía

Pmv: peso del material vegetal

El resultado se reportó como miligramos (mg) de material extraíble para cada solvente o mezcla solvente por cada gramo (g) de material vegetal seco.

3.8 Análisis de microscopía

Se tomó una muestra de cada uno de los materiales y se hidrató con agua. Los tejidos se obtuvieron mediante cortes transversales y longitudinales de tallos y hojas. Algunos tejidos fue necesario clarificarlos mediante humectación con solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 1 hora. Se colocaron las muestras sobre láminas de vidrio cubiertas con laminillas. La observación se realizó bajo el microscopio óptico con ocular 10x y objetivos 4x, 10x y 40x.

Se utilizaron los siguientes reactivos sobre los cortes antes de cubrirlos con las laminillas para detección histoquímica:

Componente	Reactivo
Taninos	Cloruro férrico TS
Aceites, grasas y resinas	Sudan rojo III
Almidón	Solución Yodo VS
Paredes lignificadas	Fluoroglucinol TS durante dos minutos/ secar Ácido clorhídrico TS
Oxalato de calico	Ácido sulfúrico TS En luz polarizada, son birrefringentes.

Tabla 3-3. Reactivos para identificación microscópica

3.9 Análisis de cenizas totales

Se tararon crisoles en una mufla durante 1 hora a 500-600°C. Posteriormente se colocaron en un desecador y se dejaron enfriar durante 30 minutos después de los cuales se registró el peso. Se tomaron entre 1 a 2 g de muestra de material vegetal y se pesaron en el crisol exactamente. Se incineraron en una cabina hasta que no se desprendieron más vapores y se colocaron en la mufla durante 4 horas. Al observar el aspecto blanco de las cenizas se retiraron del calor y se colocaron en un desecador durante 30 minutos, tiempo después del cual se registró el peso.

$$\% \text{ cenizas totales} = \frac{(P_{crmv} - P_{crv})}{(P_{mv})} * 100$$

P_{crmv}= peso del crisol con material vegetal después de incineración

P_{crv}= peso del crisol vacío

P_{mv}= peso del material vegetal

3.10 Análisis cenizas insolubles en ácido

Se tomó el residuo de las cenizas totales y se adicionaron 10 mL de ácido clorhídrico al 7% p/v en una cápsula. Se colocó cada cápsula a ebullición durante 5 minutos, cubierta con un vidrio de reloj. Posteriormente se filtró a través de un papel libre de cenizas y se enjuagaron el vidrio de reloj y el crisol con agua destilada caliente, hasta que el filtrado se encontró neutro tras la verificación con papel indicador. Se colocó el papel filtro sobre el crisol nuevamente, se incineró a 500°C durante (4) cuatro horas. Se dejó enfriar en un desecador y finalmente se determinó el peso del mismo.

$$\% \text{ cenizas insolubles} = \frac{(P_{fcr})}{(P_{ct})} * 100$$

P_{fcr}= peso final de crisol después de incineración

P_{ct}= peso de cenizas totales

3.11 Proceso de extracción

Se tomaron 25 g de material vegetal de cada una de las muestras y se humedecieron con 50 mL de solvente (agua, mezcla agua:etanol 96% (50:50) o etanol 96%). Se adicionaron 100 mL de solvente y se colocaron en baño maría durante 1 hora en reflujo a 80°C. Se filtró a través de papel en un embudo obteniendo la porción de filtrado N°1. Se adicionaron 100 mL de solvente nuevamente, se colocó el balón a ebullición durante 1 hora y se filtró al vacío con embudo Büchner. Por último se lavó el residuo seco con 20 mL de solvente, obteniendo la porción de filtrado N°2.

Se juntaron las dos porciones de filtrado y se llevaron a sequedad empleando diferentes metodologías, dependiendo del solvente utilizado. Los extractos acuosos se almacenaron en frascos de vidrio previamente tarados, se congelaron y se secaron en liofilizador. Los extractos hidroalcohólicos y etanólicos, se concentraron en rotavapor hasta aproximadamente 25 mL. Posteriormente, fueron transferidos a una cápsula previamente tarada y se secaron en baño maría y luego en estufa a 40°C hasta sequedad. Se pesó cada cápsula después del enfriamiento y se determinó el rendimiento del proceso de extracción.

$$\text{Material extraíble} \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{(P_{ce} - P_{cv}) * 4}{P_{mv} (g)}$$

P_{ce}: peso de cápsula/ frasco con el extracto

P_{cv}: peso de la capsula vacía

P_{mv}: peso del material vegetal

El resultado se reportó como miligramos (mg) de material extraíble para cada solvente o mezcla solvente por cada gramo (g) de material vegetal seco.

3.12 Índice de espuma

Se tomó 1 g de material vegetal de cada una de las muestras con tamaño de partícula superior a 380 µm y se sometió a ebullición, durante 30 minutos en un Erlenmeyer que contenía 100 mL de agua destilada. Posteriormente se enfrió y se filtró recogiendo en un balón de 100 mL y completando a volumen. Se prepararon diluciones del extracto en tubos de ensayo de 16 mm de diámetro, de la siguiente manera:

N°	Extracto (mL)	Agua destilada (mL)
1	1	9
2	2	8
3	3	7
4	4	6
5	5	5
6	6	4
7	7	3
8	8	2
9	9	1
10	10	0

Tabla 3-4. Diluciones seriadas para determinación de índice de espuma

Se realizó agitación de las mezclas en los tubos en forma vertical durante 15 segundos y se dejó en reposo por 15 minutos. Finalmente se midió la altura de la capa de espuma remanente.

Se llevó a cabo el mismo procedimiento con un patrón de saponinas, pesando 0,015 g del estándar en 100 mL de la cual se efectuaron las diluciones y se procedió bajo el mismo tratamiento de las muestras.

Los resultados se interpretaron de acuerdo con los siguientes criterios:

Criterio	Índice de espuma
La altura de la columna de espuma de todos los tubos es menor a 1 cm	IE ≤ 100
Si en algún tubo la altura de la columna es 1 cm o mayor, se debe calcular el índice de acuerdo a la fórmula $IE = \frac{1000}{(Ve)}$ <p>Ve: volumen de extracto del tubo que presenta altura de espuma 1 cm</p>	100 ≤ IE ≤ 1000
Si la altura de la columna es mayor a (1) un cm en todos los tubos Se debe realizar una nueva serie de diluciones.	IE ≥ 1000

Tabla 3-5. Criterios de evaluación para la determinación del índice de espuma

3.13 Microbiología

Se tomaron 10 g de cada una de las muestras y se adicionaron a una bolsa Stomacher Bag con 90 mL de agua peptonada. Se introdujo en el equipo mezclador Stomacher 400 durante 30 segundos a 2500 rpm. Se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-3} y se tomó 1 mL de cada bolsa el cual se adicionó en las cajas con medio de cultivo para obtener los recuentos de microorganismos.

Recuento	Medio de cultivo	Inoculo	Condición de análisis
RTV	Agar TSA	1 mL de muestra	Incubación 24h-36h / 37°C
Hongos y levaduras	Agar OGYE	1 mL de muestra	Incubación 3-5 días / 22- 25°C
Enterobacterias Coliformes	Agar VRBL	1 mL de muestra	Incubación 24h / 37°C

Tabla 3-6. Condición de análisis para indicadores de contaminación microbiológica

La muestra restante de las bolsas Stomacher se incubó durante 24 h a 37°C para el aislamiento e identificación de algunos microorganismos patógenos.

Los agares se prepararon en agua destilada de acuerdo a las instrucciones de cada uno y se adicionó aproximadamente 20 mL en cada medio de cultivo en las cajas de Petri que se dejaron enfriar hasta coagulación.

Cada una de las muestras fue analizada bajo las siguientes condiciones:

Análisis	Medio de cultivo	Inoculo	Condición de análisis
<i>Salmonella</i>	Caldo Selenito	Se tomó 1 mL de cada bolsa y se colocó en un tubo con 10 mL. Los tubos se incubaron a 37°C /24h	Para el aislamiento se sembró en medio selectivo BS (Bismuto Sulfito) y S-S (Salmonella –Shigella). Las cajas se dejaron en incubación a 37°C por 24h – 48 h. Para la identificación se tomaron colonias de los agares selectivos y se sembraron en los medios y caldos para reacción bioquímica.
	Caldo Tetrionato	Se tomó 1 mL de cada bolsa y se colocó en un tubo con 10 mL de caldo con lugol. Los tubos se incubaron a 43°C /24h	
Bacilos Gram negativos Enterobacterias	Agar EMB	1 mL de muestra	Incubación 24h-48h/37°C
<i>Staphylococcus</i>	Agar Baird Parker	1 mL de muestra	Incubación 24h-48h/37°C
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Agar Cetrimide	1 mL de muestra	Incubación 18-24h/37°C
<i>Clostridium perfringes</i>	Agar TSN	1 mL de muestra	Anaerobiosis/ 37°C 18— 24 horas (46°C 18-24h)

Análisis	Medio de cultivo	Inoculo	Condición de análisis
<i>Bacillus cereus</i>	Agar Caseina, peptona, manitol, NaCl, Sulfato Mg, fosfato disodico, fosfato monopotasio,	Se toman 10 mL de cada bolsa y se hace tratamiento de esporulación 85°C / 5 minuto Se adiciona 1mL de muestra al caldo	Se aplica la muestra en medio selectivo y se incuba 24 -48 h /37°C. Para la identificación se tomaron colonias del agar selectivo y se sembró en el caldo para reacción bioquímica.

Tabla 3-7. Condiciones de análisis para caracterización de microorganismos patógenos

3.14 Caracterización de metabolitos secundarios

Cromatografía en capa delgada (CCD)

Se tomaron los extractos secos obtenidos por el método de digestión para obtener las fracciones utilizadas en cromatografía de capa delgada de acuerdo a los procesos definidos para detección de cada metabolito. Se utilizaron capilares para aplicar sobre láminas de 6 x 7 cm de cromatofolios de sílica gel 60F 254. El frente de solvente se estableció en 5 cm.

Las fases móviles fueron preparadas en las proporciones mencionadas en las tablas 3-8, 3-9, 3-10, 3-11 y 3-12 se saturaron las cámaras de vidrio utilizadas durante 15 minutos. Se introdujeron las placas en las cámaras y se dejó correr el solvente hasta el frente, el cual estaba señalado en cada uno de los cromatofolios. Se observaron las placas en visible, luz UV 264 nm y luz UV 365 nm antes y después de revelar químicamente en las condiciones relacionadas a continuación.

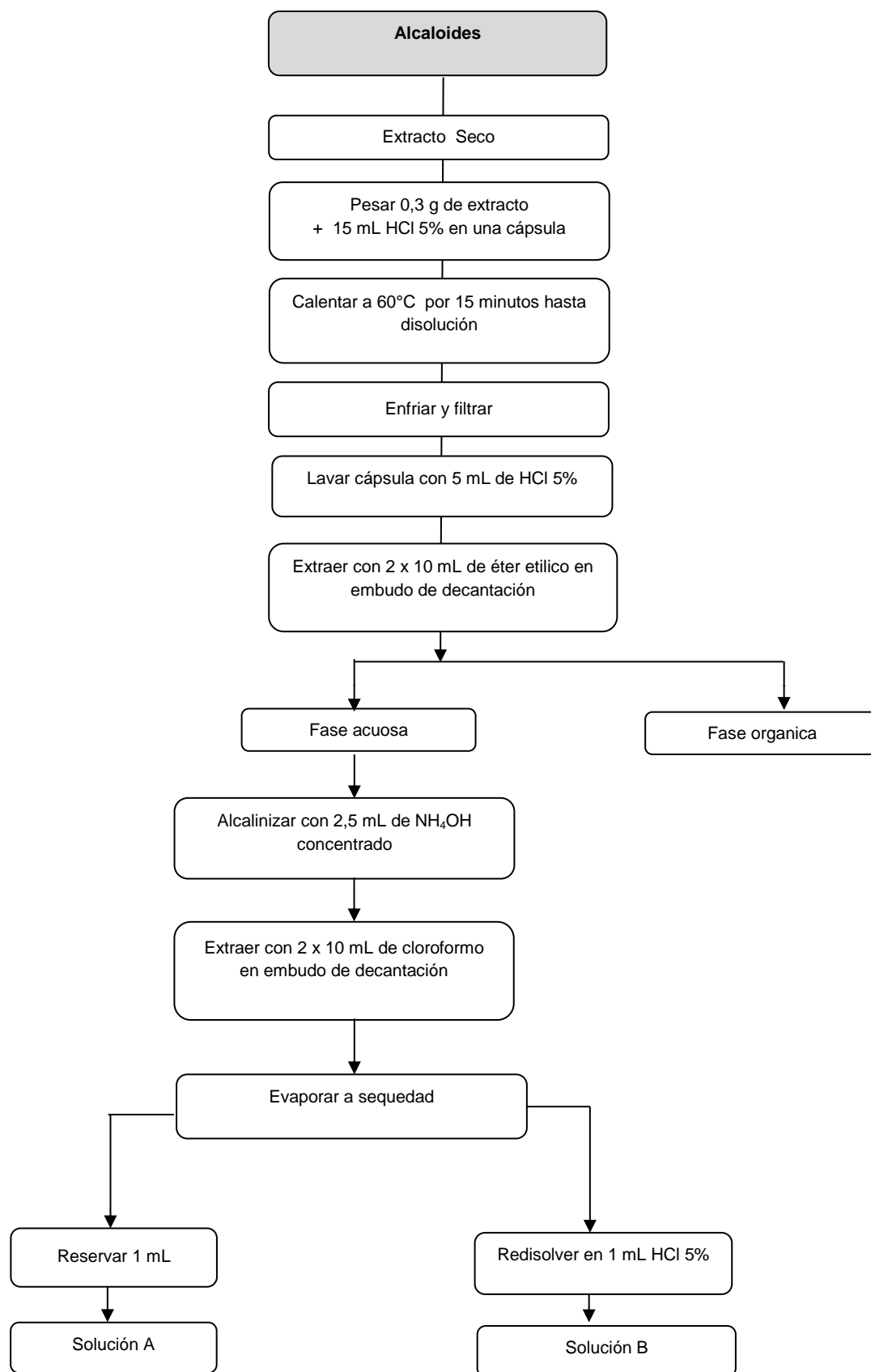


Figura 3-1. Proceso de obtención de extracto para detección de alcaloides

Metabolito	Muestra	CCD			Pruebas de precipitación		
		Fases móviles	Detección con reacción química	Detección sin reacción química	Procedimiento	Reactivo	Resultado esperado
Alcaloides	Solución A	Metanol:amoniaco (99:1) Acetato de etilo-Metanol-Agua (100:13,5:10) Cloroformo :metanol (9:1) Tolueno-Acetato de etilo-Dietilamina (70:20:10).	Reactivo Dragendorff: Manchas color naranja sobre fondo amarillo que persisten por 24 h. Si se requiere se debe calentar la placa a 100°C.	254 nm : fluorescencia la mayoría de alcaloides 365 nm: Algunos fluorescencia azul o amarillo.	N/A	N/A	N/A
	Solución B	N/A	N/A	N/A	Se toma cada tubo de ensayo (solución en medio ácido) y se adicionan 2 o 3 gotas de los reactivos de precipitación: Los resultados se evalúan conforme al patrón. (-) no hay coloración (+): coloración (++) Precipitado leve (+++) precipitado abundante	Mayer	Precipitado color crema
						Valser	Precipitado color crema
						Reineckato de amonio	Precipitado color blanco/crema
						Dragendorff	Precipitado color rojo naranja
Patron	Quinina / Brucina				Quinina / Brucina		

Tabla 3-8. Condiciones de análisis CCD y pruebas cualitativas para detección de Alcaloides.

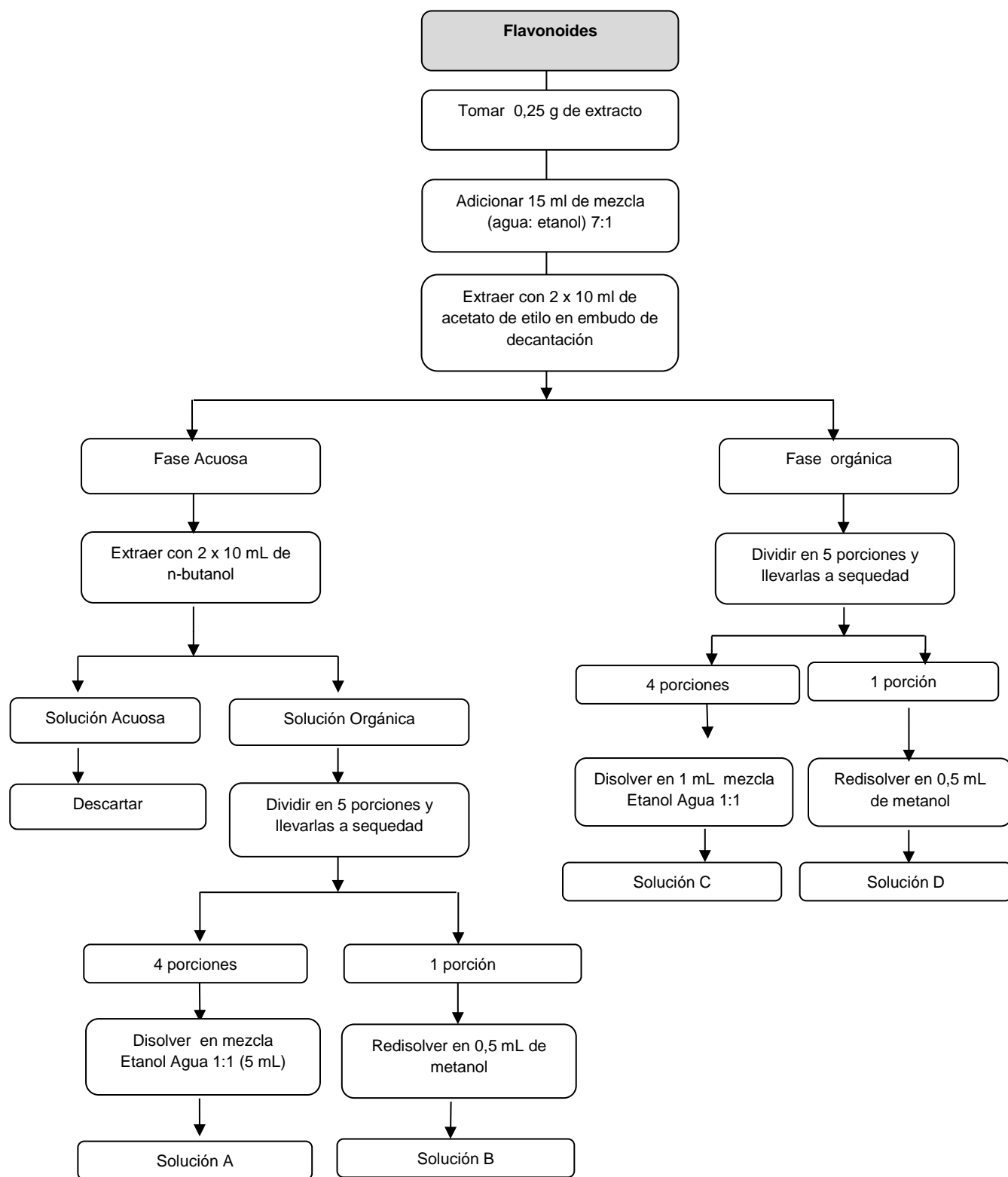


Figura 3-2. Proceso de obtención de extracto para detección de Flavonoides

Metabolito	Muestra	CCD				Pruebas de coloración/precipitación		
		Procedimiento	Fase Móvil	Detección con reacción química	Detección sin reacción química	Procedimiento	Reactivo	Resultado esperado
Flavonoides	Solución B y D	Aplicar con un capilar en la placa. Asperjar reactivo A. dejar secar. Asperjar reactivo B. Dejar secar. Observar a la luz UV 365 nm	Acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:27)	NP-PEG: Reactivo A: Reactivo NP 1% en metanol B: Solución PEG 4000 (5% en etanol)	Observar al visible, 254 nm y 365 nm antes y después de revelar	N/A	N/A	N/A
	Solución A y C	N/A	N/A	N/A	N/A	Tomar 0,5 mL de extracto en un tubo de ensayo y adicional una gota del reactivo	Cloruro férrico al 10%	Precipitado marrón, verde o azul
		N/A	N/A	N/A	N/A	Colocar en un tubo algunos mg de magnesio y 2mL de extracto y gota a gota el ácido hasta finalizar el gas	Magnesio HCl concentrado	Observar el color de la solución naranja, rojo o violeta
		N/A	N/A	N/A	N/A	Colocar 2 mL de solución y 1 mL de ácido. Calentar 20-30 minutos en baño maría.	HCl concentrado	Observar el color de la solución naranja, rojo o violeta
	Patron	Rutina / Quercetina				Rutina / Quercetina		

Tabla 3-9. Condiciones de análisis CCD y pruebas cualitativas para detección de Flavonoides

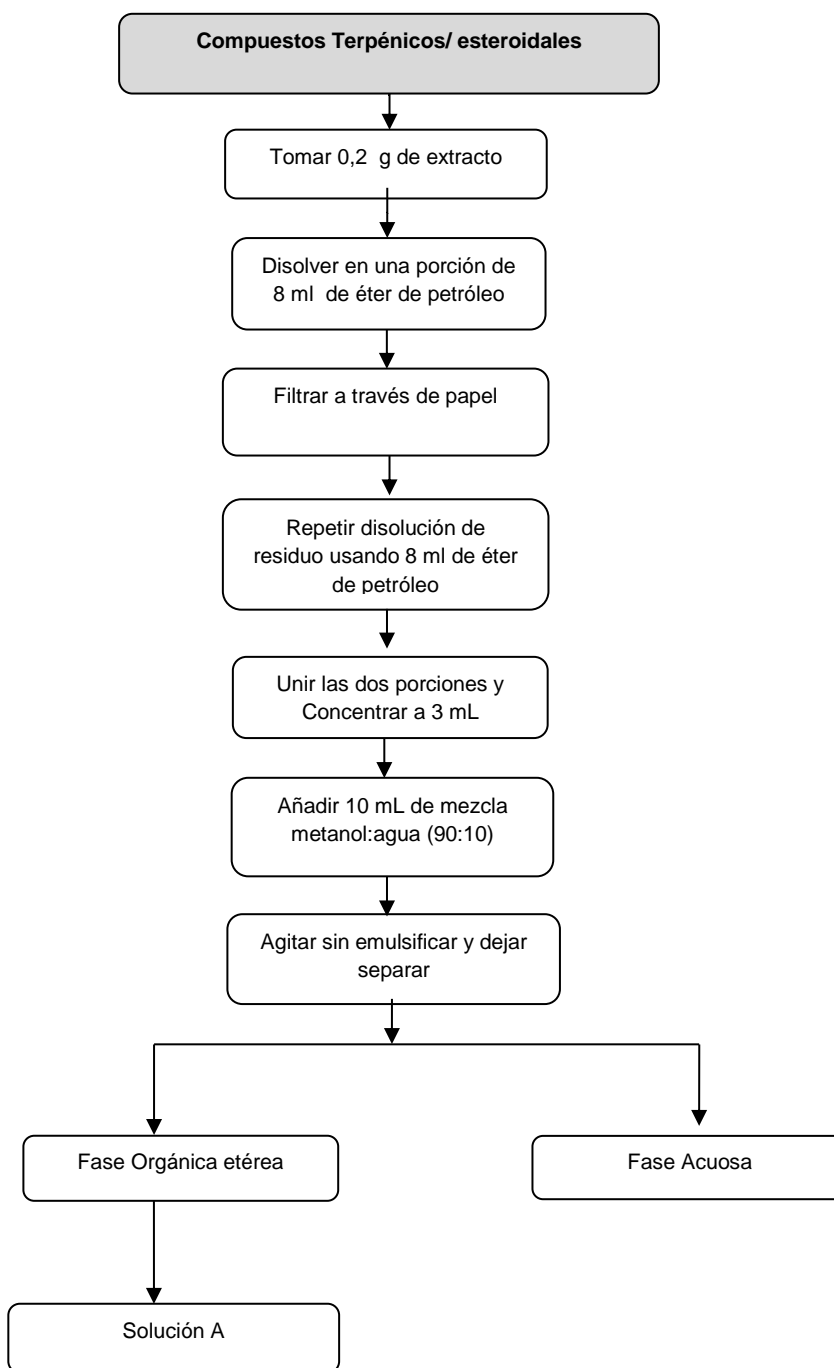


Figura 3-3. Proceso de obtención de extracto para detección de compuestos terpénicos/esteroidales

Metabolito	Muestra	CCD				Pruebas de coloración/precipitación		
		Procedimiento	Fase Móvil	Detección con reacción química	Detección sin reacción química	Procedimiento	Reactivo	Resultado esperado
Compuestos Terpenicos/ esteroidales	Solución A	Aplicar con un capilar en la placa Asperjar reactivo dejar secar en estufa 100°C 5-10 minutos Observar a la luz UV 365 nm y en visible	Cloroformo: Metanol (95:10) Acido acetico: Metanol: Agua (77:15:8) Eter de petróleo: Acetato de etilo (8:2)	Reactivo Lieberman Burchard	N/A	N/A	N/A	N/A
	Patron	Colesterol / Lupeol / Triterpenos de Yátago				N/A		

Tabla 3-10. Condiciones de análisis CCD y pruebas cualitativas para detección de compuestos Terrpénicos/esteroidales

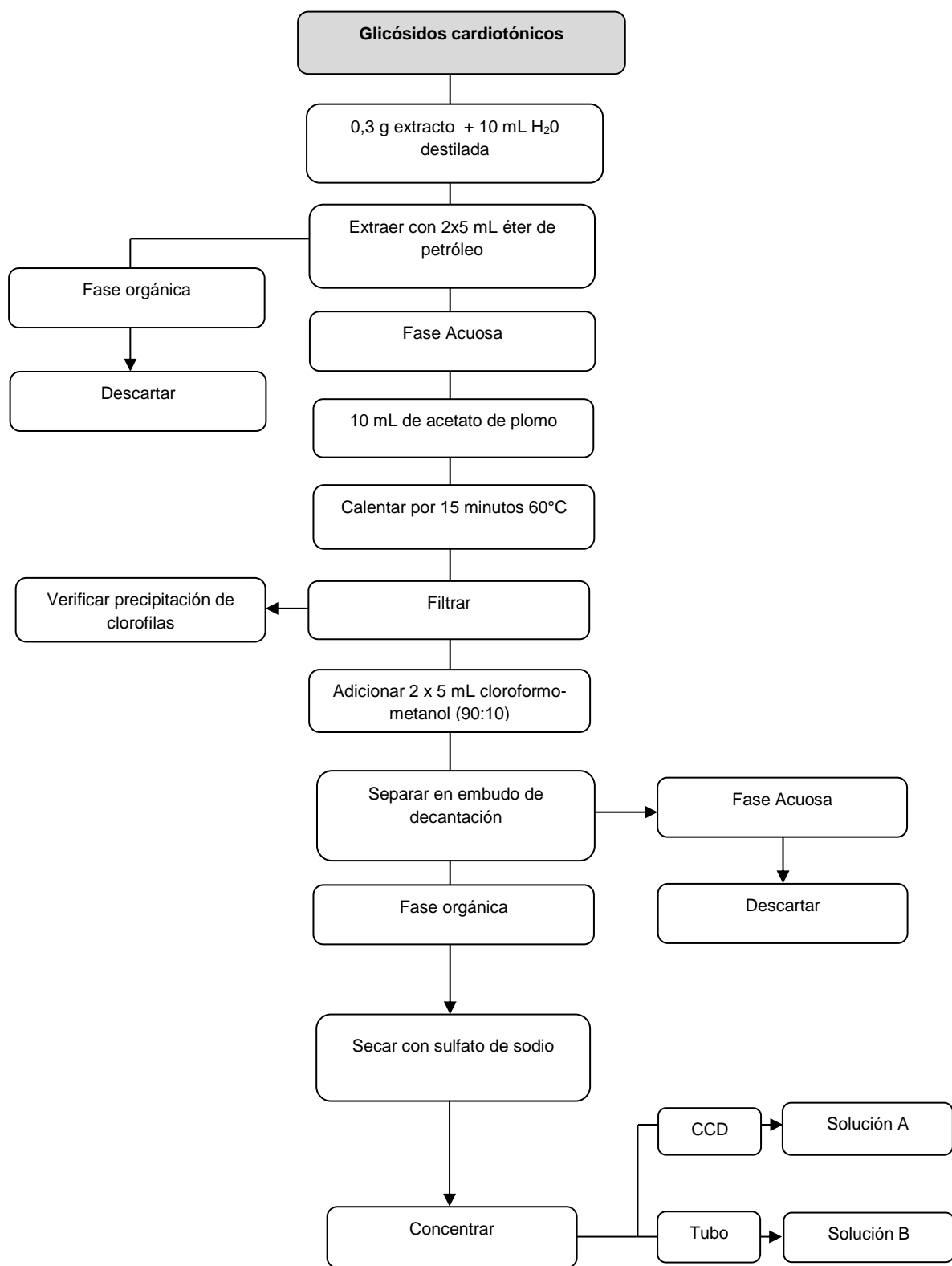


Figura 3-4. Proceso de obtención de extracto para detección de glicósidos cardiotónicos

Metabolito	Muestra	CCD				Pruebas de coloración/precipitación		
		Procedimiento	Fase Móvil	Detección con reacción química	Detección sin reacción química	Procedimiento	Reactivo	Resultado esperado
Glucósidos cardiotónicos	Solución A	N/A	N/A	N/A	N/A	A la muestra problema sin solvente se le agrega 1 mL de reactivo	Reactivo de Kedde: solución 1 : 0,1 g de ácido 3,5 dinitrobenzoico en 10 mL de metanol que debe estar recién preparada Solución 2: solución de NaOH al 10% en etanol Se mezclan 2 mL de solución 1 y 1 mL de solución 2.	Coloración rojo violeta en 5 minutos
		N/A	N/A	N/A	N/A	En un tubo de ensayo se evaporan 5 mL del extracto clorofórmico hasta sequedad en baño maría. Al residuo se le agregan 3 mL de reactivo y se calienta 3 minutos en baño maría	Reactivo de xantidrol 100 mL de ácido acético al 96% se le agrega 1 mL de HCl concentrado y 0,1 mL de xantidrol al 10%.	Coloración roja
	Solución B	Aplicar con un capilar en la placa. Asperjar reactivo	Fase móvil: éter de petróleo : acetato de etilo(70:30) cloroformo : metanol (9:1)	Reactivo de Kedde	N/A	N/A	N/A	N/A
		Aplicar con un capilar en la placa Asperjar reactivo. Dejar secar. Asperjar reactivo B. dejar secar. Observar a la luz UV 365 nm	Fase móvil: éter de petróleo : acetato de etilo (70:30) cloroformo : metanol (9:1)	Vainillina en etanol 1%/ ácido fosfórico	N/A	N/A	N/A	N/A
	Patron	Extracto de <i>Digitalis purpurea</i>				Extracto de <i>Digitalis purpurea</i>		

Tabla 3-11. Condiciones de análisis CCD y pruebas cualitativas para detección de glicósidos cardiotónicos

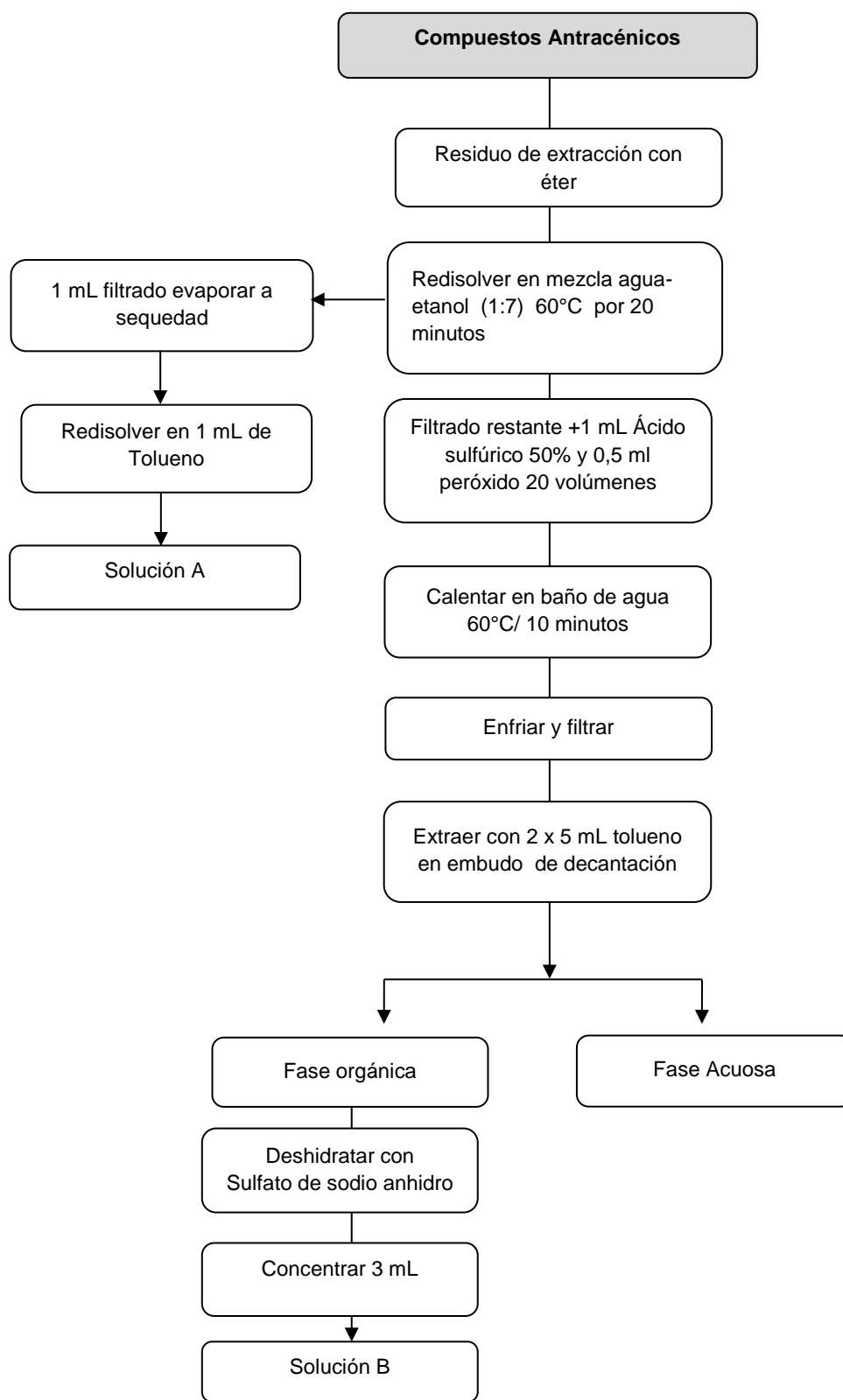


Figura 3-5. Proceso de obtención de extracto para detección de compuestos antracénicos

Metabolito	Muestra	CCD				Pruebas de coloración/precipitación		
		Procedimiento	Fase Móvil	Deteccion con reacción química	Detección sin reacción química	Procedimiento	Reactivo	Resultado esperado
Glicósidos antracénicos	Solución A	Aplicar con un capilar en la placa	Tolueno- acetato de etilo-ácido acético (75:24:1) Acetato de etilo-Metanol-Agua (100:17:13) Acetato de etilo-Metanol-Agua (100:13,5:10)	KOH al 10% en etanol Manchas color naranja, rojo, rosado en visible. Con fluorescencia amarilla o para que cambia a rojo, violeta o verde (365 nm)	254 nm: Fluorescencia débil de antraquinonas. 365 nm : Fluorescencia amarillo-rojo café	Tomar 1 mL de solución y agregar 1 mL de reactivo. Agitar y dejar que se separen las dos capas.	NaOH 5% que contiene 2% de NH ₄ OH	Coloración rosada en la capa alcalina que se intensifica con el tiempo.
	Solución B	Aplicar con un capilar en la placa	Tolueno- acetato de etilo-ácido acético (75:24:1) Acetato de etilo-Metanol-Agua (100:17:13) Acetato de etilo-Metanol-Agua (100:13,5:10)	KOH al 10% en etanol Manchas color naranja, rojo, rosado en visible. Con fluorescencia amarilla o para que cambia a rojo, violeta o verde (365 nm)	254 nm : Fluorescencia débil de antraquinonas. 365 nm : Fluorescencia amarillo-rojo café	Tomar 1 mL de solución y agregar 1 mL de reactivo. Agitar y dejar que se separen las dos capas.	NaOH 5% que contiene 2% de NH ₄ OH	Coloración rosada en la capa alcalina que se intensifica con el tiempo.
	Patrón	Antrona				Antrona		

Tabla 3-12. Condiciones de análisis CCD y pruebas cualitativas para detección de compuestos antracénicos

3.15 Detección de saponinas

Se evaluó la presencia de saponinas mediante el test de hemólisis de glóbulos rojos reportada por Sanabria en 1983 y se realizó una comparación con la metodología reportada por OMS, 2013.

- **Preparación del extracto de material vegetal**

Se pesaron 2,5 g de material vegetal y se extrajeron durante 30 minutos a 80°C con una porción inicial de 15 mL de una mezcla etanol-agua (1:7) y se filtró. Posteriormente se continuó la extracción 15 minutos a 80°C con una porción de 10 mL, se filtró el extracto y se juntó con el anterior reuniendo 20 mL. Para retirar los taninos se adicionó 1 g de Oxido de magnesio, se dejó en baño maría durante 15 minutos y se filtró en caliente por un papel filtro utilizando 10 mL de etanol 96% caliente para lavar el residuo. El extracto obtenido fue concentrado hasta 3 mL.

3.15.1 Detección de Saponinas (Método Sanabria, 1983)

- **Preparación de suspensión normalizada de glóbulos rojos**

La suspensión se preparó mezclando 10 mL de sangre fresca y una solución de cloruro de sodio 0,9% hasta completar 100 mL. Se centrifugó a 2000 rpm durante 3 minutos desechando el sobrenadante y se repitió el procedimiento. Los glóbulos rojos se suspendieron en solución salina 0,9% hasta completar 400 mL. Se realizó una prueba con 0,5 mL de solución de saponinas patrón para verificar si ocurría hemólisis en menos de 10 minutos a 5 mL de suspensión de globulos rojos. Considerando que no ocurrió hemólisis total, fue necesario diluir la suspension de globulos rojos usando la relación 3 mL de suspensión de sangre: 2 mL de solución salina 0,9%.

- **Preparación de patrón**

El patrón se preparó utilizando una solución de saponinas al 1% en mezcla agua:etanol (1:7). Se realizó la prueba utilizando 1 mL de solución y 5 mL de glóbulos rojos

diluída, mezclando levemente sin generar espuma y dejando en reposo durante 10 minutos. La hemólisis total se evidenció por transparencia de la solución.

- **Análisis de muestras**

Para realizar el análisis se tomó 1 mL de extracto y 5 mL de la suspensión de glóbulos rojos diluida, se mezcló levemente y se dejó en reposo la mezcla durante 10 minutos.

El blanco se preparó utilizando 1 mL de agua destilada y 5 mL de suspensión normalizada de glóbulos rojos.

3.15.2 Detección de Saponinas (Método OMS, 2011)

- **Suspensión de eritrocitos**

Se tomó 1 mL de sangre fresca con citrato de sodio y se llevó a volumen 50 mL con buffer de fosfatos pH 7.4.

- **Patrón**

Se tomaron 10 mg de saponinas y se llevaron a volumen de 100 mL con buffer de fosfatos pH 7.4.

Se realizó el ensayo preliminar usando las siguientes mezclas, las cuales se agitaron levemente sin formar espuma. Se realizó agitación 30 minutos después y se dejó en reposo a temperatura ambiente durante 6 horas, después de lo cual se revisó la hemólisis total evidenciada por transparencia de la solución.

N° Tubo	Volumen Extracto (mL)	Volumen de buffer fosfatos (mL)	Volumen de suspensión de eritrocitos (mL)
1	0,10	0,90	1,00
2	0,20	0,80	1,00
3	0,50	0,5	1,00
4	1,00	N/A	1,00
PATRON	1,00	N/A	1,00

Tabla 3-13. Condiciones de preparación de muestras para determinación de saponinas por hemólisis.

3.16 Metodología de cuantificación fenoles totales

La concentración de fenoles totales fue medida por espectrofotometría UV, teniendo como principio la reacción colorimétrica de óxido-reducción, siendo en este caso el reactivo de Folin-Ciocalteu el agente oxidante.

Curva de calibración

Para la preparación de la solución madre de ácido gálico, se pesaron exactamente cerca de 1 mg de estándar (1,1 mg) y se le adicionó 1 mL de etanol 96% (solución A).

Para preparar las soluciones de los puntos de la curva de calibración (0,3-11 µg/mL de AG) se tomó un volumen de la solución madre el cual se completó con etanol 96% a 1 mL y posteriormente se tomó un volumen de 100 µL de cada solución (soluciones B) para generar la reacción, llevando a volumen final 2 mL (soluciones C).

N°	Volumen solución A (µL)	Volumen Etanol (µL)	Volumen final de Solución (µL)	Concentración solución B (µg/µL)	Volumen solución B (µL)	Cantidad ácido gálico (µg)	Volumen final solución reacción (mL)	Concentración solución C (µg/mL)
1	200	800	1000	0,220	300	66	2	33,0
2	100	900	1000	0,100	300	30	2	15,0
3	50	950	1000	0,055	300	16,5	2	8,2
4	25	975	1000	0,027	300	8,25	2	4,1
5	12,5	987,5	1000	0,014	300	4,125	2	2,0
6	6,25	993,75	1000	0,007	300	2,062	2	1,0

Tabla 3-14. Diluciones para preparación de muestras para curva de calibración en cuantificación de fenoles totales

- Preparación de las muestras**

Se pesaron exactamente 1,0-1,5 mg de extracto seco de material vegetal y se llevó a volumen de 1 mL con etanol 96%. Se utilizó el agitador vortex para lograr la disolución de los extractos.

- Preparación de muestras para análisis**

Se tomaron 300 µL de los extractos etanólicos diluidos y de cada una de las soluciones B para la preparación de la curva de calibración y se les adicionó 300 µL el mismo volumen del reactivo de Folin-Ciocalteu concentrado y se agitó.

Posteriormente se agregaron 600 μL de una solución de Carbonato de sodio Na_2CO_3 al 7,5%, finalmente se llevó a un volumen de 2 mL con agua destilada y se dejó reposar durante dos horas.

La absorbancia fue medida en equipo BIORAD X Nork Microplate Spectrometer a 726 nm. Los resultados fueron expresados en mg de ácido gálico / g de extracto (mg AG/ g extracto).

3.17 Análisis estadístico

Los análisis de caracterización fueron realizados por triplicado y los datos fueron analizados con pruebas t-student para medias con varianzas iguales y diferentes utilizando un α de 0,05.

Se realizaron pruebas F para varianza de dos muestras y así establecer la prueba t-student más adecuada con un α de 0,05.

Para la comparación entre más de tres muestras o establecer la influencia de una variable de proceso sobre la variable respuesta se utilizó el análisis ANOVA de un factor o multifactorial α de 0,05.

4. RESULTADOS y DISCUSIÓN

4.1 Obtención del material vegetal

Un ejemplar de la muestra obtenida de crecimiento silvestre fue determinado taxonómicamente por S. Díaz-Piedrahita como *Momordica charantia* L. y depositado en el Herbario Nacional Colombiano bajo el código de identificación COL 571600.

En general el material vegetal de las muestras se encontraba en buenas condiciones con presencia de alguna porción de tierra proveniente de las raíces, insectos y algunas partes aéreas de otras plantas atrapadas en los zarcillos.

4.1.1 Colecta

Las muestras se colectaron de cultivo y de crecimiento silvestre en diferentes meses del año. Es importante mencionar que la época lluviosa fue definida como la época en la cual se presentó un mayor número de lluvias. Las condiciones ambientales de cada una de las épocas en las cuales se recolectaron las muestras se encuentran en el *Anexo 7-2 Datos resumidos de condiciones ambientales en Cali 2013-2014*.

Mes	Año	Precipitación (mm)	Días de lluvia	Época
Agosto	2012	37,58	10	Lluviosa
Diciembre	2012	8,13	5	Seca
Enero	2013	10,92	2	Seca

Tabla 4-1. Condiciones climáticas en la época de colecta de muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L.

La identificación de las muestras se encuentra resumida en la Tabla 4-2.

UBICACIÓN	ÉPOCA DE COLECTA	FUENTE	CÓDIGO MUESTRA
Palmira , Valle del Cauca	Agosto 2012 Lluviosa	Crecimiento silvestre	S-LI
Candelaria, Valle del Cauca	Diciembre 2012 Seca	Cultivo	C-Se
Palmira , Valle del Cauca	Enero 2013 Seca	Crecimiento silvestre	S-Se

Tabla 4-2. Identificación de muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L.

- **Condiciones del cultivo**

El cultivo fue desarrollado en el centro experimental de la Universidad Nacional sede Palmira (CEUNP) por el grupo de investigación de plantas medicinales. Las condiciones bajo las cuales se desarrolló el cultivo, al igual que el análisis de suelos se resumen a continuación:

Nombre Científico	<i>Momordica charantia</i> L.
Nombre Común	Archucha
Siembra	
Fecha de siembra de los semilleros	9 Mayo de 2012
Fecha de trasplante al campo	30 de septiembre de 2012
Altitud	927 m.s.n.m
Precipitación promedio anual	1100 mm
Temperatura promedio diaria	24,5 °C.
Humedad relativa promedio diaria	65%.
Riegos	1-2 semanales (con microaspersión)
Desyerbas	Manualmente con azadón cada 15 días
Recolección	
Recolección de material fresco	7 de diciembre de 2012
Cantidad de material recolectado	5 kg de material fresco

Tabla 4-3. Información general del cultivo desarrollado en CEUNP.

RESULTADOS DE ANÁLISIS DE SUELOS		
N° Laboratorio	394SP	
Profundidad (cm)	0-60	
Resultados	Contenido	
pH	7,47	Alcalino
M.O	2,25%	Moderado
P	183,8 ppm	Muy alto / excesivo puede ser perjudicial
S	5,5 ppm	Moderado
Ca	8,36 Cmol/kg	Abundante
Mg	5,96 Cmol/Kg	Abundante
K	0,90 Cmol/Kg	Abundante
Na	0,22 Cmol/Kg	Muy pobre
ClCe	15,44	
B	0,24 mg/Kg	Moderado

Cu	3,4 mg/Kg	Abundante
Fe	19,0 mg/Kg	Pobre o insuficiente
Mn	2,6 mg/Kg	Deficiente
Zn	0,9 mg/Kg	Muy pobre
Textura	Far	
C.E	0,29 dS/m	Deficiente
Ca*Mg/K	16	
a.s.n.m	1600 m	
Ca/Mg	1,40	

Tabla 4-4. Información de la caracterización del suelo de CEUNP.



Figura 4-1. Cultivo desarrollado en centro experimental Universidad Nacional sede Palmira CEUNP

4.2 Secado del material vegetal

De acuerdo con la tabla 3-2 se mencionó que el proceso de secado para las tres muestras fue diferente por disponibilidad del equipo en el momento de la colecta de cada una, y dada la necesidad de reducir la humedad para asegurar su preservación.

Inicialmente el proceso de secado se había planteado en un horno a temperatura de 40°C considerando que no se disponía de información relacionada con la estabilidad del material. Sin embargo, el proceso de secado no fue el mismo para todas las muestras lo cual pudo generar alguna variación que podría inferir en los resultados de los análisis fisicoquímicos. No obstante, se razonó también como una oportunidad, representando alternativas al




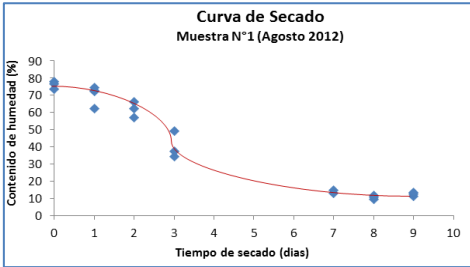
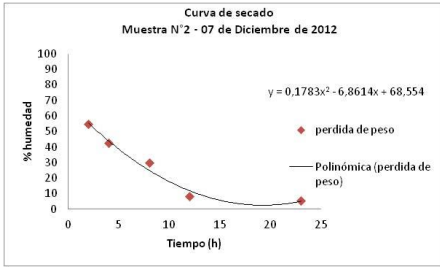
proceso convencional de secado que pueden ser utilizadas fácilmente por cultivadores, y que aportan información sobre el comportamiento del material tras la manipulación generada con cada método.

En todos los casos se presentó una pérdida de humedad de alrededor del 86,5% lo cual es consistente con lo reportado en la farmacopea vegetal caribeña 84,6% para el material vegetal fresco de esta planta (Robineau, 2007, Sharapin, 2000^a) y lo reportado en general para material vegetal fresco (Sharapin, 2000^b). El material seco obtenido era friable y tenía humedad residual entre 5,5 - 13,5%, lo que se ajusta a la condición más favorable para proteger el material vegetal del crecimiento microbiológico y degradación química de metabolitos secundarios de interés.

El proceso de secado empleando bombillos como fuente de calor fue el que arrojó la mayor pérdida de humedad, sin embargo fue el método con mayor dificultad para controlar tanto la temperatura como para lograr una distribución homogénea del calor para todo el material.

En cuanto al proceso de secado al ambiente, requirió mayor tiempo para lograr la pérdida de humedad deseada, y cuando alcanzó una humedad residual del 11%, nuevamente empezó a adquirir humedad del ambiente lo cual es desfavorable. A pesar de que el material estuvo expuesto a recibir mayor cantidad de polvo del ambiente esto no afectó considerablemente el contenido de cenizas insolubles en ácido (Tabla 4-27), ni se evidenció un impacto sobre los resultados de caracterización microbiológica del material como se puede observar más adelante (Tabla 4-28).

De acuerdo con los resultados resumidos en la Tabla 4-5, se puede visualizar que el proceso de secado en horno a 40°C es la mejor alternativa para el tratamiento del material, puesto que es más rápido, se logra un contenido de humedad residual (pérdida por secado) inferior al 10% y el proceso es homogéneo en el material. A pesar de que el horno artesanal (calentamiento con bombillos) logró resultados similares en tiempo y humedad residual, debe tenerse en cuenta que es menor el control de la temperatura y algunas partes más cercanas a la fuente de calor podrían verse afectadas por una mayor exposición a altas temperaturas.

MUESTRA	Silvestre época Lluviosa (S-LI)	Cultivo época seca (C-Se)	Silvestre época seca (S-Se)
Fecha de Recolección	14 de Agosto de 2012	07 de diciembre de 2012	16 enero de 2013
Condición de secado	A temperatura ambiente expuesto sobre una superficie limpia plana y a la sombra.	En horno de secado artesanal con calentamiento con bombillos.	Horno de secado con recirculación de aire.
Fotografía			
Tiempo de secado	10 días	24 horas	24 horas
Condición de secado	Temperatura ambiente en Cali Max 32°C Min 17,0°C Humedad Max 96% Min 35%	40±10 °C	45°C -47,5°C
Pérdida por secado total (%)	78,03%	68,55%*	No determinado
Humedad y volátiles remanente (%)	13,24%	5,49%	8,14%
Curva de control de secado			No determinado***

*Calculado mediante formula de regresión polinómica.

** No se realizó seguimiento del proceso de secado. Se dejó el material durante 24 horas y se determinó la humedad residual, encontrando un valor cercano al 10%, por lo cual se suspendió el proceso de secado y se retiró el material del horno.

Tabla 4-5. Información sobre el proceso de secado de las muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L.

4.3 Molienda del material vegetal

Se utilizó una licuadora industrial para la molienda del material. Se cortó en trozos y fue triturado por pulsos durante aproximadamente 1,0- 1,5 minutos. El aspecto del material molido de cada una de las muestras puede observarse en la Figura 4-2.

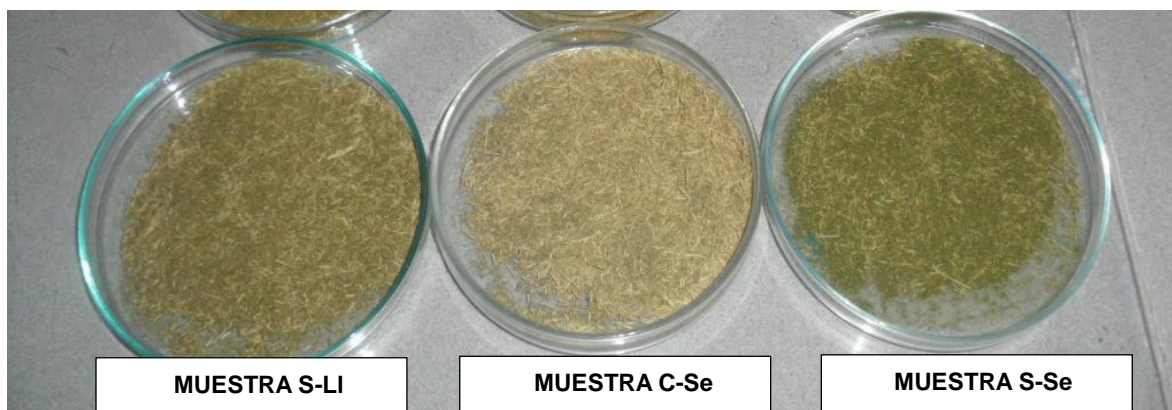


Figura 4-2. Fotografía de muestras de material vegetal molido

El material vegetal de todas las muestras evidencia segregación en dos tamaños. Las partículas de mayor tamaño corresponden a tallos fibrosos. Las partículas en polvo más fino provienen de las hojas molidas.

El color de las tres muestras también se atribuye a las partes de la planta abundantes en cada muestra, siendo más verde y pequeño cuando predominaban hojas, y amarillo de mayor tamaño cuando había mayor contenido de tallos y zarcillos. Con base en esto, la muestra nativa colectada en época lluviosa (S-LI), es una mezcla de todas las partes aéreas y tallos de la planta, la muestra de cultivo (C-Se) tenía abundantes tallos y zarcillos. La muestra nativa colectada en época seca (S-Se) básicamente estaba compuesta por hojas.

Los frutos fueron separados de cada una de las muestras para ser molidos y analizados de forma independiente.

4.4 Descripción física del material vegetal fresco

Pertenece al grupo de las angiospermas vasculares. Es una planta herbácea y trepadora con zarcillos.

Hojas

Son hojas simples de 4- 5 cm de longitud, color verde, rastreras, suaves y no presentan vellosidades. Son unifoliadas, pecioladas, de venación reticulada. Se encuentran de forma alterna y son caulinares. Las hojas tienen 5 lóbulos que cuales los dos ubicados en la base de la hoja se subdividen en 2 lóbulos cada uno; son levemente dentadas. Las hojas adultas llegan a medir 7-10 cm de longitud y 5-7 cm de ancho, de color verde oscuro. Los peciolo son delgados y miden de 1-3 cm de largo. Primera hojas palmeadas no lobuladas. Configuración acorazonada. Los filos son pubescentes y suaves.



Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca

Tallos y zarcillos

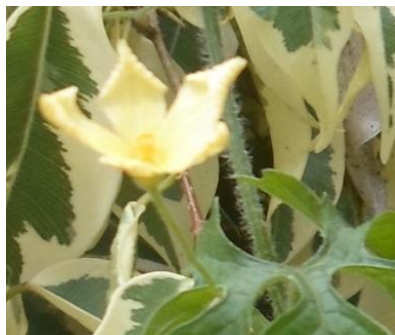
Los tallos son verdes, delgados y con vellosidades. Son rastreros y presentan nudos y yemas terminales con zarcillo. Presenta una raíz principal leñosa de la cual se desprenden raíces laterales.



Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca

Flores

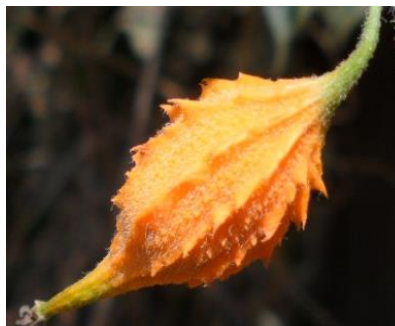
Presenta cáliz diferenciado de la corola. Son flores solitarias, unisexuales de 5 pétalos amarillos, redondeados y cóncavos de 1 cm de largo. Presenta sépalos de 5mm. La Flor es dialipétala, cariofilácea y pluricarpelar.



Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca

Frutos

Son espinosos de color verde y durante la maduración adquieren color naranja. Son alargados de dimensiones entre 5-35 mm de largo y 5-22 mm de ancho de acuerdo a su estado de desarrollo.



Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca



Semillas

Las semillas son elípticas con cubierta de color rojo de máximo 10 mm de longitud. Se encuentran alrededor de 15-20 semillas en cada fruto maduro.



Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca

4.5 Descripción del material vegetal seco entero

Muestra	Fotografía	Descripción
Silvestre época Lluviosa (S-LI)	 <p data-bbox="621 1144 792 1161">Laura Carlos, 2013 Bogota</p>	<p>Material principalmente compuesto por tallos gruesos, secos pero rígidos y no se fragmentan fácilmente. Los zarcillos que se desprenden de los mismos son delgados y frágiles.</p> <p>Las hojas son color verde oscuro, rugosas y friables.</p>
Cultivo época seca (C-Se)	 <p data-bbox="591 1837 763 1854">Laura Carlos, 2013 Bogota</p>	<p>El material está compuesto por tallos y hojas.</p> <p>Se observan algunos tallos delgados y gran proporción de hojas verdes, rugosas y friables.</p> <p>Se encuentran tallos gruesos de gran extensión entrecruzados unos con otros sin presencia de hojas color amarillo-café.</p>


Muestra	Fotografía	Descripción
Silvestre época seca (S-Se)	 <p>Laura Carlos, 2013 Bogota</p>	<p>El material está compuesto por tallos delgados y mayor proporción de hojas.</p> <p>Las hojas son de color verde oscuro, rugosas y friables.</p>

Tabla 4-6. Descripción física de las muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L. seco sin moler

4.6 Descripción de material vegetal seco /molido

Atributo	Muestra Silvestre época lluviosa (S-LI)	Muestra de Cultivo época seca (C-Se)	Muestra silvestre época seca (S-Se)
Color	Predominantemente verde con mezcla amarillas	Predominantemente amarillo con algunas partículas verdes	Predominantemente verde Verde
Olor	Herbáceo Intensidad: III Produce un sabor amargo al oler	Herbáceo Intensidad: I Produce un sabor amargo al oler	Herbáceo Intensidad: II Produce un sabor amargo al oler
Sabor	Amargo	Amargo	Amargo
Aspecto físico	Fibroso principalmente	Mezcla fibroso/ partículas friables	Polvo con algunas fibras
Fotografía			

Tabla 4-7. Descripción física de material vegetal molido de muestras de cultivo y ejemplares de recolección silvestre

El material vegetal molido de las muestras difiere en su color y aspecto, lo cual está asociado a la abundancia de hojas o tallos en cada una. El olor herbáceo y el sabor residual amargo se perciben en las tres muestras, aunque con algunas diferencias en intensidad por lo cual se organizaron en forma ascendente (intensidad I, II y III). La muestra silvestre recolectada en época lluviosa (S-LI) reflejaba el olor más intenso lo cual podría atribuirse a

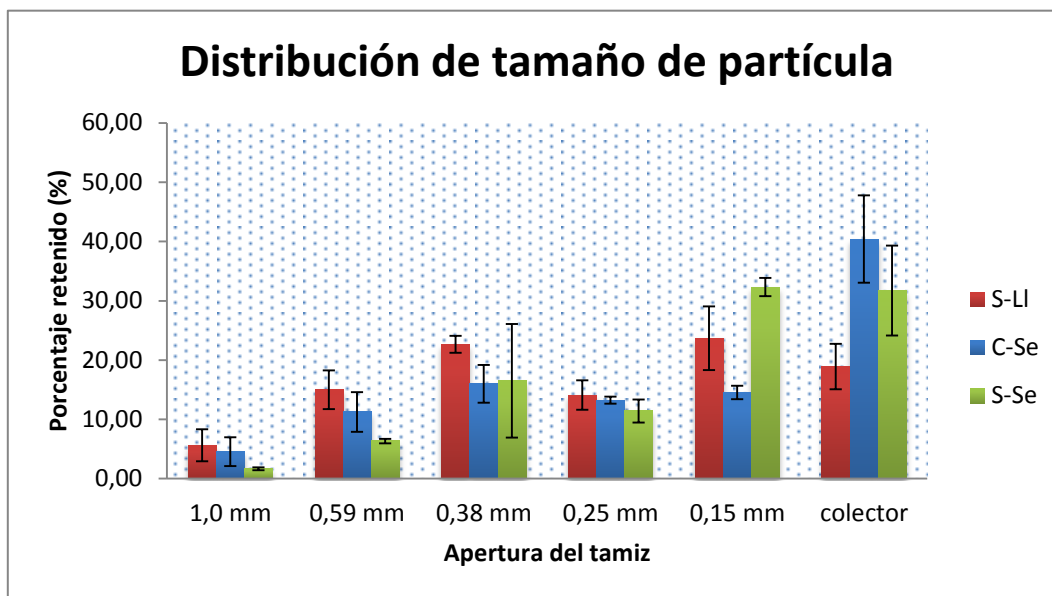
que tuvo un mayor tiempo de almacenamiento previo análisis, pues su recolección fue cuatro meses antes de las demás muestras.

4.7 Tamaño de partícula

Condiciones ambientales: Humedad 49% /Temperatura: 19,4°C

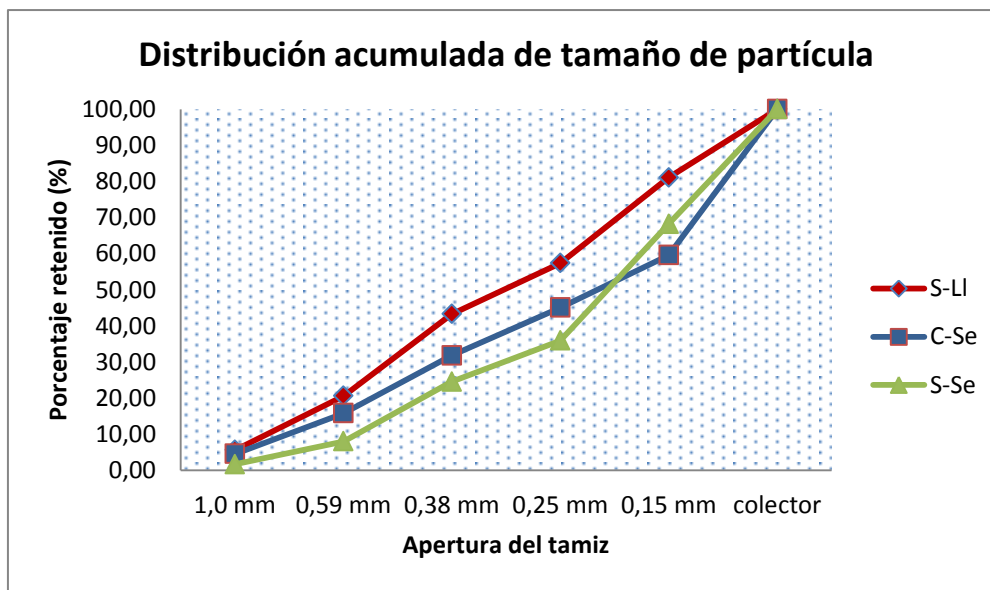
	% Retenido			Promedio	Desviación Estándar
Muestra	Muestra Silvestre época lluviosa (S-LI)				
Tamiz	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1,0 mm	4,27	8,73	3,88	5,63	2,693
0,59 mm	12,64	18,73	13,64	15,00	3,268
0,38 mm	22,05	21,61	24,29	22,65	1,436
0,25 mm	12,81	16,97	12,54	14,10	2,482
0,15 mm	29,45	18,83	22,83	23,70	5,362
Colector	18,79	15,14	22,83	18,92	3,847
	% Retenido			Promedio	Desviación Estándar
Muestra	Muestra cultivo época seca (C-Se)				
Tamiz	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1,0 mm	2,97	7,33	3,34	4,55	2,418
0,59 mm	9,11	15,13	9,56	11,27	3,356
0,38 mm	14,55	19,65	13,80	16,00	3,185
0,25 mm	13,38	12,59	13,77	13,24	0,600
0,15 mm	14,68	13,36	15,57	14,54	1,113
Colector	45,31	31,94	43,97	40,41	7,364
	% retenido			Promedio	Desviación Estándar
Muestra	Muestra silvestre época seca (S-Se)				
Tamiz	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3		
1,0 mm	1,46	1,97	1,60	1,68	0,264
0,59 mm	5,97	6,73	6,35	6,35	0,378
0,38 mm	11,02	27,57	10,94	16,51	9,579
0,25 mm	12,34	9,19	12,74	11,42	1,945
0,15 mm	31,52	31,34	34,07	32,31	1,526
Colector	37,69	23,20	34,31	31,73	7,579

Tabla 4-8. Porcentaje de material vegetal retenido en la batería de tamices para las muestras de material vegetal molido de *Momordica charantia* L.



Grafica 4-1. Distribución de tamaño de partícula de las muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L.

A pesar de no disponer de los tamices recomendados (OMS) para tener una clasificación del material vegetal por su tamaño, de acuerdo con la disponibilidad de los mismos, se obtuvo un material vegetal mixto con una porción de tamaño “fino” de alrededor del 60% que pasa por la malla de tamaño 150 μm y una porción “gruesa” del máximo 40% con tamaño mayor a 380 μm . Lo anterior viene asociado a la friabilidad hojas frente a los tallos tras la molienda, lo cual produce una distribución de tamaños de partículas con ese comportamiento.



Grafica 4-2. Distribución acumulada de tamaño de partícula de las muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L.

4.8 Humedad residual

Muestra	Contenido de humedad (%)			Promedio	Desviación Estándar	IC*
	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3			
Muestra Silvestre-Época Lluviosa (S-LI)	12,89	10,17	10,94	11,33 ^a	1,401	11,33 ± 3,480
Muestra Cultivo-Época Seca (C-Se)	9,45	9,14	9,44	9,34 ^a	0,179	9,34 ± 0,444
Muestra Silvestre-Época Seca (S-Se)	10,62	10,28	10,65	10,52 ^a	0,208	10,52 ± 0,516

* Intervalo de confianza 95% y α 0,05

^a No hay diferencia significativa entre las muestras, con 95% de confianza.

Tabla 4-9. Resultados humedad residual en muestras de material vegetal molido de *Momordica charantia* L.

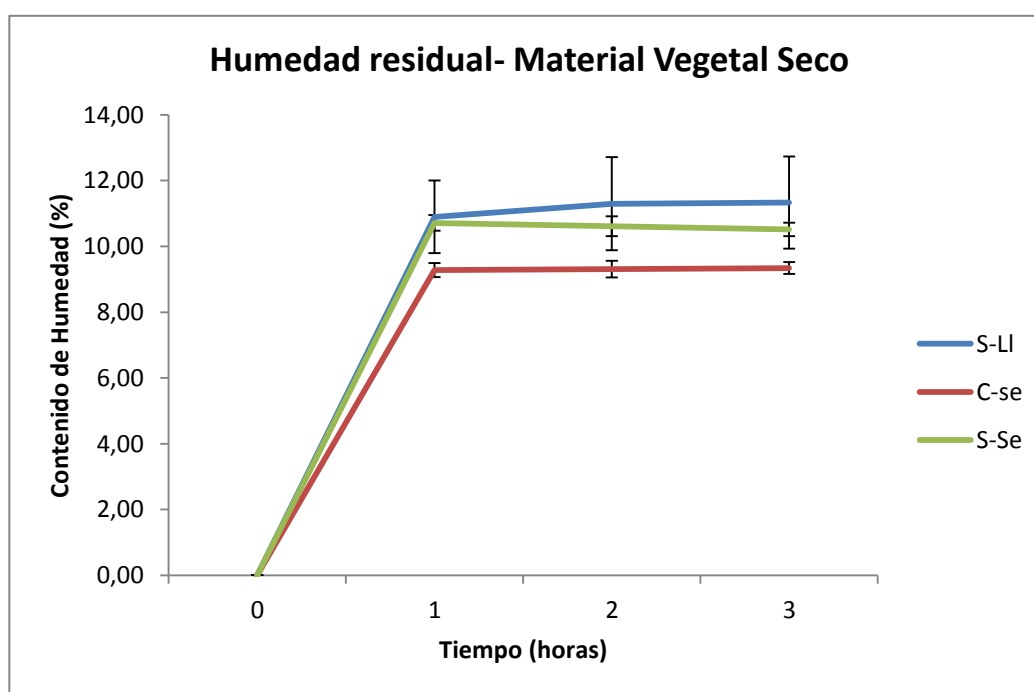


Gráfico 4-3. Comportamiento del porcentaje humedad residual en función del tiempo.

Se puede evidenciar que el contenido de humedad y sustancias volátiles de las muestras se encuentra entre 9,3 y 11,3%, lo cual está acorde con lo referenciado 8-14%, en función de reducir procesos degradativos de tipo químico y microbiológico (Sharapin, 2000^a, Sharapin, 2000^b).

Al realizar el análisis de varianza se evidencia que no existe diferencia significativa entre las medias de los resultados de humedad de las muestras de material vegetal de recolección silvestre y cultivo, con 95% de confianza. Sin embargo es de aclarar que la varianza de los grupos si difiere.

La muestra que evidencia una mayor dispersión en los resultados, es la muestra de secado al ambiente (S-LI), posiblemente porque todo el material vegetal no quedó expuesto de la misma forma a esta condición de secado, que es superficial.

Estos resultados evidencian que independiente del método utilizado para secado, el material vegetal logra un equilibrio con la humedad ambiental similar. Sin embargo, debe tenerse en cuenta la conservación del material y adecuada manipulación, que para este caso fue almacenamiento sin moler en bolsa de papel cerrada, protegido del calor, la humedad, insectos y polvo.

4.9 Material extraíble

A continuación se resumen los resultados de material extraíble obtenidos para cada una de las muestras bajo las condiciones de extracción específicas en la cual fue variable el proceso de extracción, tamaño de partícula del material vegetal y el solvente de extracción:

Muestra	Tamaño de particular	Solvente	Proceso de extracción en frío		Proceso extracción en caliente	
			ME (mg) / PMV (g)	Rendimiento (%)	ME (mg) / PMV (g)	Rendimiento (%)
S-LI-1	Fino	Agua	223,219	22,3	147,45	14,8
S-LI-2	Grueso	Agua	164,969	16,5	150,02	15,0
S-LI-3	Fino	Agua:Etanol (50:50)	206,535	20,7	173,24	17,3
S-LI-4	Grueso	Agua:Etanol (50:50)	163,185	16,3	200,66	20,1
S-LI-5	Fino	Etanol	53,906	5,4	118,60	11,9
S-LI-6	Grueso	Etanol	23,892	2,4	66,10	6,6
C-Se-1	Fino	Agua	184,861	18,5	154,14	15,4
C-Se-2	Grueso	Agua	201,899	20,2	81,46	8,2
C-Se-3	Fino	Agua:Etanol (50:50)	181,275	18,1	209,56	21,0
C-Se-4	Grueso	Agua:Etanol (50:50)	93,596	9,4	110,63	11,0
C-Se-5	Fino	Etanol	52,333	5,2	122,52	12,2
C-Se-6	Grueso	Etanol	24,558	2,5	60,33	6,0
S-Se-1	Fino	Agua	243,452	24,3	273,73	27,4
S-Se-2	Grueso	Agua	172,011	17,2	159,59	16,0
S-Se-3	Fino	Agua:Etanol (50:50)	269,192	26,9	283,68	28,4
S-Se-4	Grueso	Agua:Etanol (50:50)	194,805	19,5	176,32	17,6
S-Se-5	Fino	Etanol	110,723	11,1	173,74	17,4
S-Se-6	Grueso	Etanol	24,378	2,4	83,37	8,3

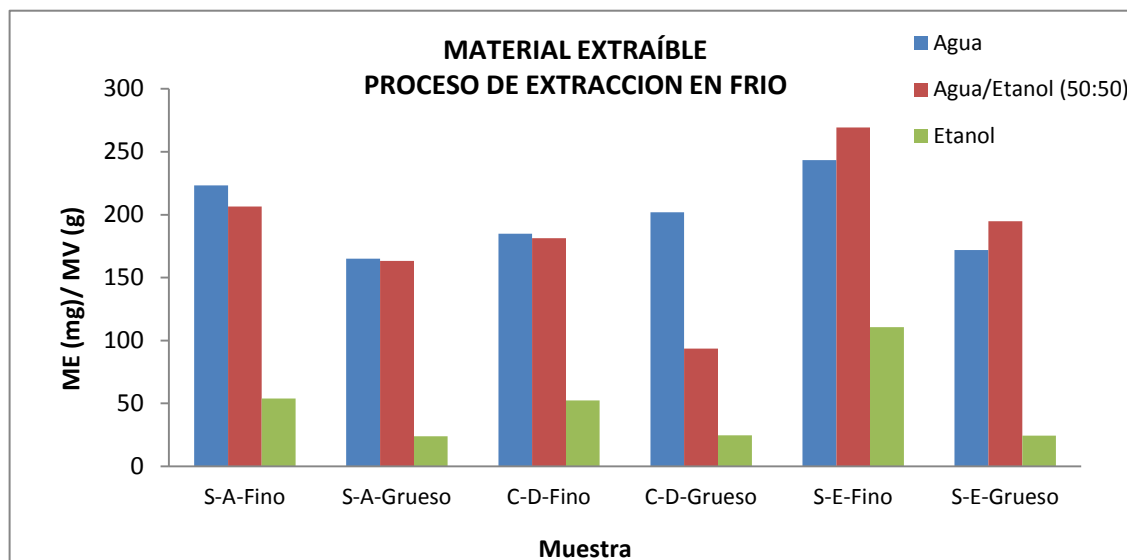
ME: material extraíble / PMV: peso del material vegetal.

*Grueso: material con tamaño superior a 380 mcm

*Fino: material con tamaño inferior a 380 mcm

Tabla 4-10. Resultados de material extraíble en proceso en frío y caliente para las muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L.

4.9.1 Proceso de extracción en frío



ME: material extraíble / MV: Material vegetal

Gráfico 4-4. Comparación de resultados de material extraíble para las muestras clasificadas por tamaño de partícula en los diferentes solventes

H₀: No hay diferencia significativa entre la media de rendimiento de los extractos elaborados con material vegetal del mismo tamaño (tamaño fino / grueso) usando proceso de maceración en frío.

Constante	Variables	F calculado	F critico	Resultado	
Tamaño fino	Muestra	18,81	6,94	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H ₀
	Solvente	109,45	6,94	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H ₀
Tamaño grueso	Muestra	0,32	6,94	$F_{crit} > F_{cal}$	Se acepta H ₀
	Solvente	15,48	6,94	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H ₀

Tabla 4-11. Resultados de análisis ANOVA manteniendo constante el tamaño de la muestra usada para extracción para el proceso en frío

Al realizar el análisis de varianza ANOVA para establecer si existe una diferencia significativa entre los resultados de material extraíble asociado a las variables del proceso de extracción, se evidencia que el solvente utilizado impacta considerablemente en el resultado siendo el alcohol etílico 96% el que logra los menores rendimientos. Adicional a esto, los extractos etanólicos se obtienen con gran contenido de clorofilas que dificultan su manipulación y purificación en análisis posteriores. Estas diferencias podrían atribuirse a que los metabolitos de esta planta son de naturaleza mas polar (glicósidos), por lo tanto se favorece su extracción en agua o mezclas solvente con alta proporción de esta (Sharapin, 2000^a). Adicionalmente para el caso de los extractos acuosos, existe una menor manipulación del extracto en el proceso de secado por liofilización que reduce pérdidas, incrementando el rendimiento.

Según los resultados del análisis ANOVA (Tabla 4-11) la fuente de la muestra impacta de forma significativa solo cuando se comparan los resultados de los extractos obtenidos de material fino (tamaño < 380 μm) donde las muestras de ejemplares silvestres tienen mayores rendimientos que la muestra de cultivo. Probablemente este comportamiento se produce porque la distribución de tamaño de partícula de la muestra de cultivo estaba representada principalmente por partículas muy finas que más allá de aumentar el área superficial, podrían formar aglomerados o compactación reduciendo el contacto con el solvente.

Respecto a la influencia de la fuente de obtención, a pesar de que con las muestras de recolección silvestre se obtienen mayores rendimientos de extracto, se observa una diferencia entre las dos muestras de esta fuente, siendo la muestra de época seca (S-Se) la de mayor rendimiento. Lo anterior puede estar asociado a que en época seca las plantas tienden a concentrar sus principios activos o en época lluvia a reducirse por efecto de lavado (Sharapin, 2000^a).

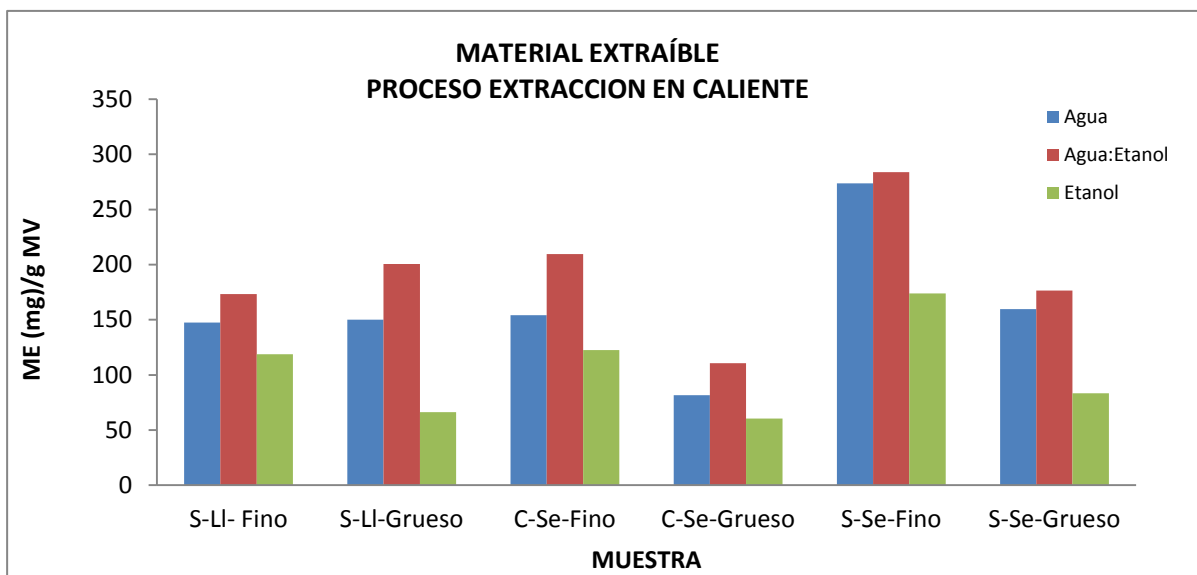
H₀: No hay diferencia significativa entre la media de rendimiento de los extractos de cada solvente (Agua: Agua Etanol 50:50/ Etanol 96%) usando diferentes muestras de material de distinto tamaño y proceso de maceración en frío.

Constante	Variables	F calculado	F critico	Resultado	
Agua	Muestra	0,11	19	$F_{\text{crit}} < F_{\text{cal}}$	Se acepta H ₀
	Tamaño	1,85	18,5	$F_{\text{crit}} < F_{\text{cal}}$	Se acepta H ₀
Agua: Etanol (50:50)	Muestra	17,28	19	$F_{\text{crit}} < F_{\text{cal}}$	Se acepta H ₀
	Tamaño	27,18	18,5	$F_{\text{crit}} < F_{\text{cal}}$	Se rechaza H ₀
Etanol	Muestra	1,01	19	$F_{\text{crit}} < F_{\text{cal}}$	Se acepta H ₀
	Tamaño	6,28	18,5	$F_{\text{crit}} < F_{\text{cal}}$	Se acepta H ₀

Tabla 4-12. Resultados de análisis ANOVA para muestras manteniendo constante el solvente para el proceso en frío

Al analizar la influencia del tamaño de partícula (fino o grueso) sobre la cantidad del material extraíble de las muestra para cada uno de los solventes (Tabla 4-12), se encuentra que solo en los procesos que utilizan mezcla solvente Agua-Etanol (50:50), existe una influencia significativa del tamaño obteniéndose mejores rendimientos con tamaño menor a 380 μm , lo cual infiere que existe una mayor área superficial de contacto entre las partículas del material y el solvente. Para cada uno de los solventes no se evidencia diferencia atribuible a la fuente de la muestra.

4.9.2 Proceso de extracción en caliente



ME: material extraíble / MV: Material vegetal

Grafico 4-5. Comparación de resultados de material extraíble para las muestras clasificadas por tamaño de partícula en los diferentes solventes

H₀: No hay diferencia significativa entre las medias de rendimiento de extractos elaborados con material vegetal del mismo tamaño (fino / grueso) usando diferentes solventes en proceso de extracción digestión en caliente.

Constante	Variables	F calculado	F critico	Resultado	
Tamaño fino	Muestra	16,77	6,94	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H ₀
	Solvente	11,08	6,94	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H ₀
Tamaño grueso	Muestra	5,64	6,94	$F_{crit} > F_{cal}$	Se acepta H ₀
	Solvente	12,27	6,94	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H ₀

Tabla 4-13. Resultados de análisis ANOVA para muestras manteniendo constante el tamaño de la muestra para el proceso en caliente

De acuerdo con los resultados de la tabla 4-13, se evidencia el mismo comportamiento que el proceso de extracción en frío, donde independiente del tamaño de partícula de las muestras, la influencia del solvente es significativa, siendo los extractos en mezcla agua-etanol los de mayor rendimiento. De la misma manera solo se observa una influencia de la fuente de la muestra cuando se comparan los resultados de las muestras de tamaño fino.

H₀: No hay diferencia significativa entre la media de rendimiento de los extractos de diferentes muestras de diferente tamaño con cada solvente (Agua/Agua:Etanol 50:50/ Etanol 96%) en proceso de digestión en caliente

Constante	Variables	F calculado	F critico	Resultado	
Agua	Muestra	2,93	19	$F_{crit} < F_{cal}$	Se acepta H_0
	Tamaño	3,23	18,5	$F_{crit} < F_{cal}$	Se acepta H_0
Agua: Etanol (50:50)	Muestra	0,87	19	$F_{crit} < F_{cal}$	Se acepta H_0
	Tamaño	1,87	18,5	$F_{crit} < F_{cal}$	Se acepta H_0
Etanol	Muestra	4,63	19	$F_{crit} < F_{cal}$	Se acepta H_0
	Tamaño	36,21	18,5	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0

Tabla 4-14. Resultados de análisis ANOVA manteniendo constante el solvente de extracción para el proceso en caliente

Al analizar el impacto del tamaño de partícula (fino o grueso) sobre la cantidad del material extraíble de cada muestra para cada uno de los solventes en el proceso en de digestión en caliente (Tabla 4-14), se encuentra que solo en los procesos que utilizan Etanol, existe una influencia significativa del tamaño obteniéndose mejores rendimientos con tamaño fino ($< 380 \mu m$), lo cual infiere que existe una mayor área superficial de contacto entre las partículas del material y el solvente, y por tanto mayor penetración en las células para extracción.

4.9.3 Comparación de los dos métodos de extracción

Teniendo en cuenta que no había influencia significativa de la muestra en los tamaños gruesos de los dos métodos de extracción, se compararon los datos de ambos procesos para establecer si había influencia en los resultados de material extraíble. Los resultados reflejan que no existe un impacto significativo atribuible al proceso de extracción y se confirma el fuerte impacto de la polaridad del solvente (Tabla 4-15).

H_0 efecto: No hay diferencia significativa en las medias de rendimiento de los extractos obtenidos con diferente solvente y proceso de extracción

H_0 interacción: La interacción de los dos factores es nula

Constante	Variables	F calculado	F critico	Resultado	
Tamaño grueso	Solvente	19,70	3,88	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0
	Proceso	0,03	4,74	$F_{crit} < F_{cal}$	Se acepta H_0
	Interacción	2,89	3,88	$F_{crit} > F_{cal}$	Se acepta H_0 de Interacción

Tabla 4-15. Resultados de análisis ANOVA para muestras comparando proceso de extracción para muestras de tamaño grueso

Por su parte la comparación de los dos métodos de extracción de las muestras de tamaño fino se analizaron para cada solvente, con la intención de verificar la influencia de la

fuelle de la muestra y del proceso de extracción sobre el material extraíble. Se evidenció que solo para las muestras extraídas con etanol en caliente, el aumento del rendimiento tiene influencia significativa de las dos variables. El resultado de material extraíble incrementa en 50-120 % al trabajar el proceso en caliente. Esto podría justificarse ya que aumentar la temperatura de extracción mejora la solubilidad de algunos metabolitos secundarios en el solvente; además debe tenerse en cuenta que en este proceso de digestión se produjo agotamiento del material realizando una segunda extracción con una porción adicional de solvente, lo cual desplaza el equilibrio de saturación que se había generado con la primera porción de solvente. Con los otros solventes (agua y mezcla agua-etanol), es probable que la temperatura favorezca mayor rapidez de la extracción por el aumento de la solubilidad de algunos compuestos, pero finalmente se obtenga un resultado que no es significativamente diferente al de los procesos en frío (Tabla 4-16).

H₀: No hay diferencia significativa entre la medias de rendimiento de los extractos de diferentes muestras de material vegetal de tamaño fino en cada solvente solvente (Agua: Agua Etanol 50:50/ Etanol 96%) usando diferentes procesos de extracción.

Constante	Variables	F calculado	F critico	Resultado	
Agua	Muestra	3,19	19	$F_{crit} < F_{cal}$	Se acepta H ₀
	Proceso	0,68	18,5	$F_{crit} < F_{cal}$	Se acepta H ₀
Agua: Etanol (50:50)	Muestra	8,99	19	$F_{crit} < F_{cal}$	Se acepta H ₀
	Proceso	0,03	18,5	$F_{crit} < F_{cal}$	Se acepta H ₀
Etanol	Muestra	290,95	19	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H ₀
	Proceso	928,11	18,5	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H ₀

Tabla 4-16. Resultados de análisis ANOVA manteniendo constante el solvente , en muestras de tamaño fino y diferentes procesos de extracción

4.9.4 Material extraíble en frutos

Muestra	Material extraíble (mg)/ material vegetal frutos (g)	Material extraíble (mg)/ material partes aéreas (g)
S-LI	149,925	173,24 - 200,66
C-Se	155,851	110,63 - 209,56
S-Se	140,992	176,32 - 283,68

Tabla 4-17. Resultados de material extraíble en proceso en caliente para las muestras de frutos de *Momordica charantia* L.

En la Tabla 4-17 Se observan valores similares del material extraíble en mezcla agua-etanol (50:50) de los frutos molidos de todas las muestras. Sin embargo, si se evidencia

una diferencia estadísticamente significativa entre el material extraíble obtenido de frutos y el resultado de partes aéreas en la misma mezcla solvente como se observa tras los resultados de análisis de varianzas y medias para grupos descrito a continuación:

Prueba F test para diferencia de varianzas

H_0 : No hay diferencia significativa en las varianzas de los grupos (frutos y partes aéreas)

F calculado	F critico	Resultado	
19,29	57,21	$F_{crit} > F_{cal}$	Se acepta H_0

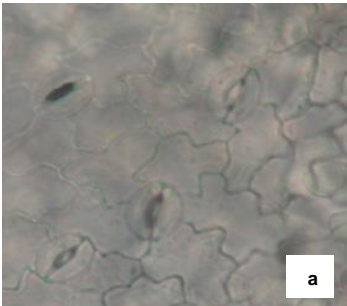
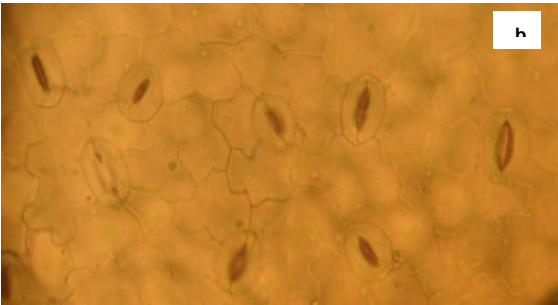
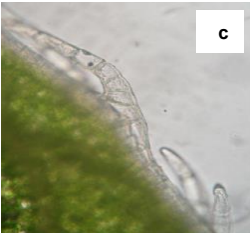

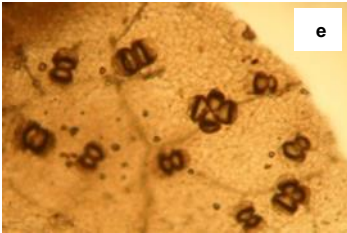


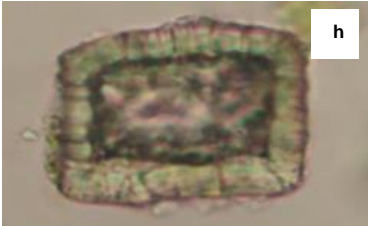
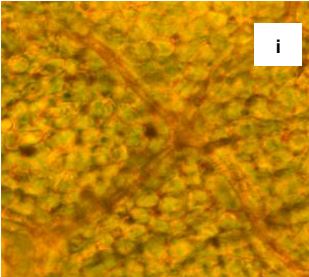
t test para diferencia de medias (asumiendo varianzas diferentes)

H_0 : No hay diferencia significativa en las media de rendimiento de los extractos hidroalcohólicos de partes aéreas y frutos.

t calculado	t critico	Resultado	
2,36	1,28	$t_{crit} < t_{cal}$	Se rechaza H_0

4.10 Análisis Microscópico

• Muestra (S-LI)

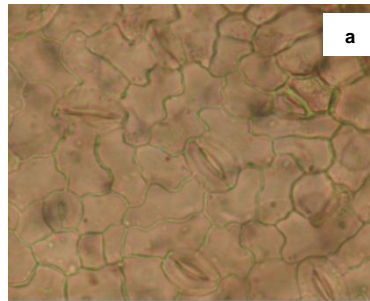
Órgano de la planta	Tejido	Características
Hojas	Epidermis	Estomas anomocíticos, únicamente en el envés (a) Epidermis de paredes sinuosas y onduladas (b)
 		
Hojas	Epidermis	Abundantes tricomas no glandulares multicelulares uniseriados, inclinados, unidos a la epidermis por una base de 2 a 5 células (c,d,e) Escasos tricomas glandulares de pedúnculo multicelular uniseriado y glándula multicelular (f)
   		
Hojas	Esclerénquima	Células pétreas (g, h)
 		
Hojas	Parénquima	Esponjoso (i)
		

Algunas fotos corresponden a cortes trasversales y longitudinales de hojas y tallos

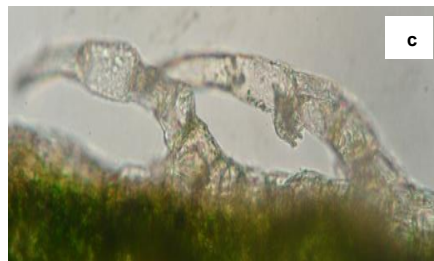
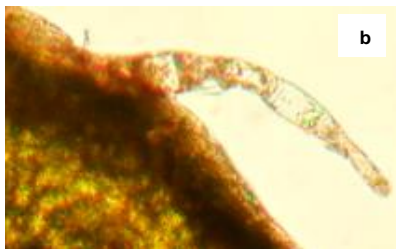
Tabla 4-18. Características microscópicas de la muestra de material vegetal (S-LI).

- **Muestra (C-Se)**

Órgano de la planta	Tejido	Características
Hojas	Epidermis	Estomas anomocíticos únicamente por el envés. Epidermis de paredes sinuosas u onduladas (a)



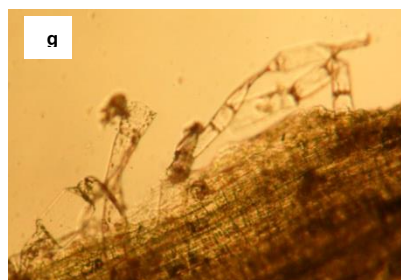
Hojas	Epidermis	Tricomas no glandulares multicelulares uniseriados, inclinados, unidos a la epidermis por 2 a 5 células (b,c,d)
-------	-----------	---

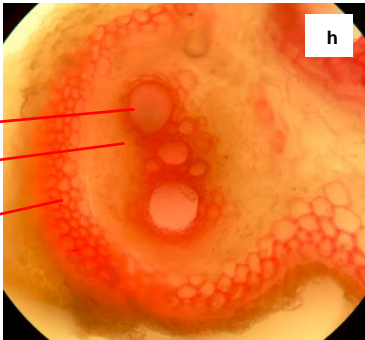
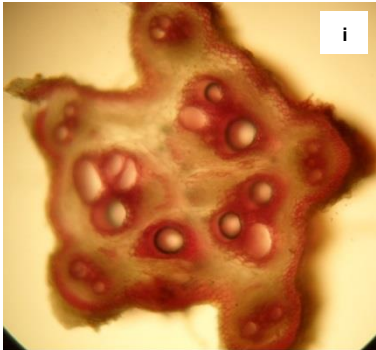
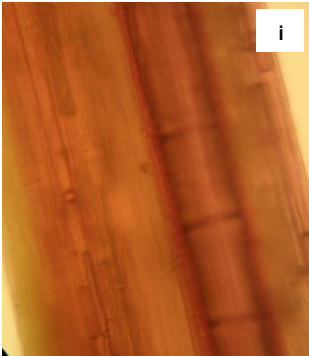
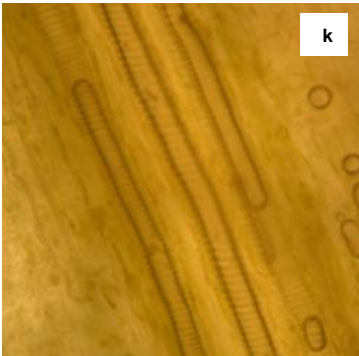


Hojas	Vascular/ Conductor	Vasos espiralados (e,f)
-------	---------------------	-------------------------



Tallos	Epidermis	Tricomas no glandulares multicelulares uniseriados espatulados (g)
--------	-----------	--

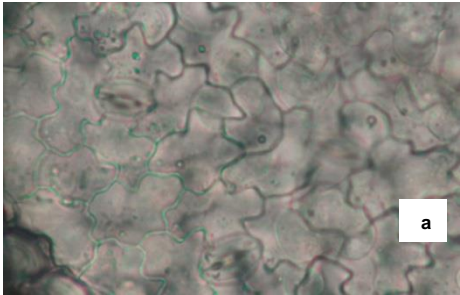




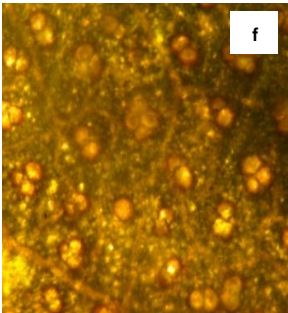
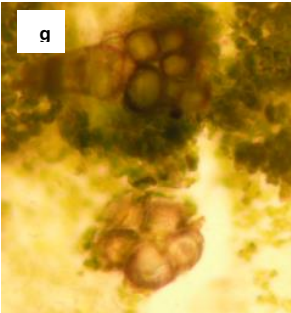
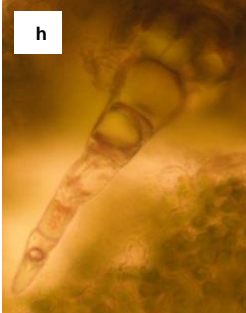




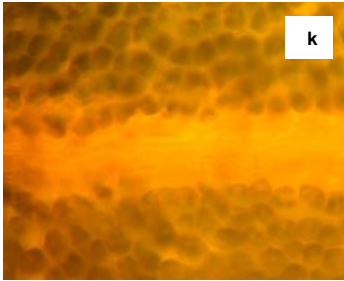
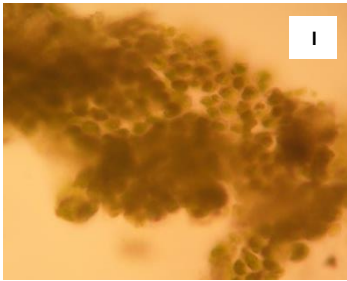
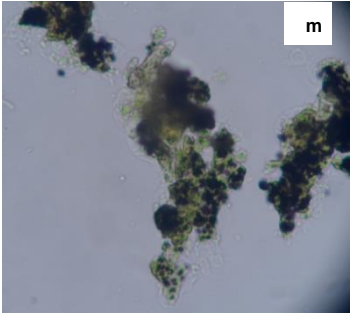
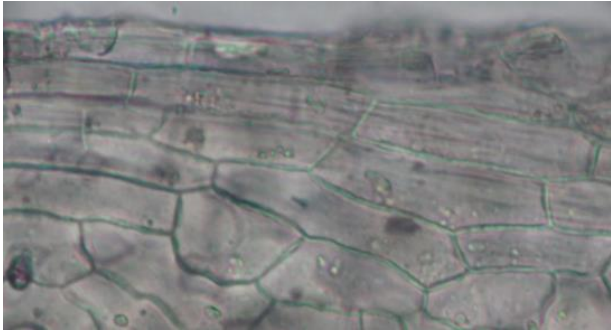
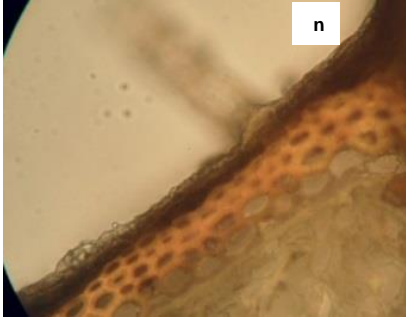

Tallos	Esclerenquima Vascular	Xilema y Floema /Grupos vasculares(h) Fibras del periciclo (i)
<div><div>Xilema</div><div>Floema</div><div>Fibras del periciclo</div></div> 		
Tallos	Vascular/Conductor	Vasos espiralados (j) Vasos reticulados (k)
		

Algunas fotos corresponden a cortes trasversales y longitudinales de hojas y tallos.

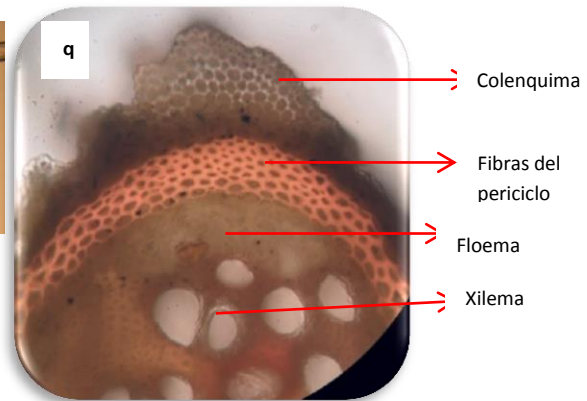
Tabla 4-19. Características microscópicas de la muestra de material vegetal (C-Se)

• Muestra (S-Se)

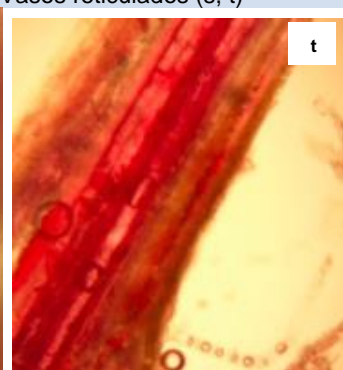
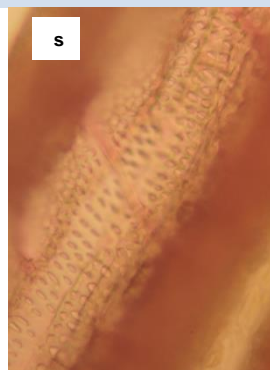
Órgano de la planta	Tejido	Características
Hojas	Epidermis	<p>Estomas anomocíticos únicamente en el envés (a)</p> <p>No se evidencian estomas en el haz (b)</p> <p>Epidermis de paredes sinuosas u onduladas</p>
 		
Hojas	Epidermis	<p>Abundantes tricomas no glandulares multicelulares uniseriados, inclinados (c)</p> <p>Algunos tricomas espatulados (d)</p> <p>Escasos tricomas glandulares de pedúnculo unicelular y glándula unicelular (e)</p> <p>Abundantes tricomas no glandulares multicelulares uniseriados, inclinados, unidos a la epidermis por una base de 2 a 5 células (f,g,h,i)</p>
  		
   		
Hojas	Epidermis	Bases de tricomas (J)
		

Hojas Tallos		Parenquima	Esponjoso (k,l)
			
Hojas		Parénquima	Reserva (almidon) (m)
			
Tallos	Epidérmico	Epidermis unicelular rugosa (n)	
			
Tallos	Epidérmico	Trícomas no glandulares multicelulares uniseriados (o)	
			

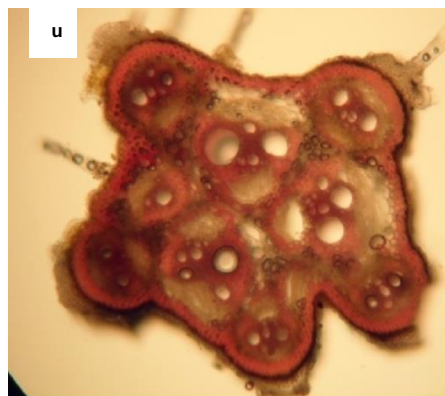
Tallos	Varios	Fibras (p) Colenquima (q) Fibras del periciclo (q) Xilema (q) Floema (q)
--------	--------	--

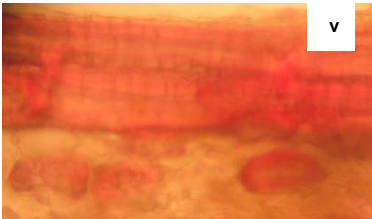
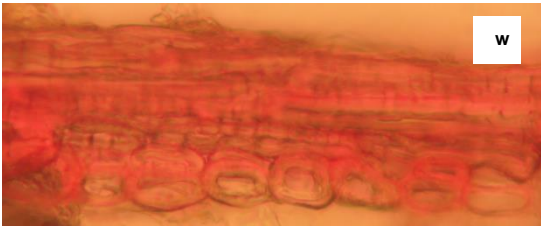
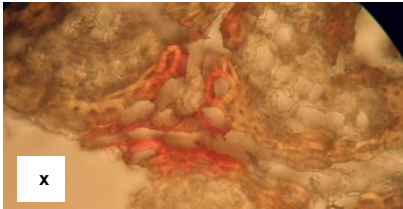


Tallos	Varios	Fibras del periciclo (r) Xilema (r) Floema (r) Vasos reticulados (s, t)
--------	--------	--



Tallos	Vascular	Grupos vasculares (u)
--------	----------	-----------------------



Tallos	Esclerenquimático	Celulas petreas (v, w, x)
		

Algunas fotos corresponden a cortes trasversales y longitudinales de hojas y tallos.

Tabla 4-20. Características microscópicas de la muestra de material vegetal (S -Se).

A pesar de que las muestras eran de orígenes diferentes, se observaron características similares en cuanto a la presencia y tipo de estomas, tricomas y distribución de tejidos en los órganos evaluados tallos y hojas como se esperaba, considerando que es la misma especie. Sin embargo el análisis pretendía identificar si la época de recolección o la fuente podrían reflejar diferencia.

Hojas

Se evidencian características similares en las tres muestras analizadas, en las cuales la epidermis presenta una cutícula delgada, rugosa y paredes levemente onduladas. Se observan algunos prismas de oxalato de calcio.

Mediante un corte longitudinal se observa presencia de tricomas no glandulares multicelulares de número variable (7-12 células) uniseriados con la punta afilada e inclinados hacia la superficie.

Tras un corte transversal de la hoja, se encuentran estomas solo en el envés de la misma en todas las muestras y son de tipo anomocítico de 4 o 5 células. Se observaron en forma abundante tricomas glandulares con tallo grueso multicelular y uniseriado, de cabeza multicelular con algunas incrustaciones. La anterior descripción es consistente con la reportada previamente por Zocoler para *Momordica charantia* L. (Zocoler, 2006).

Tallos

En los tallos se observa la presencia de tricomas no glandulares uniseriados de punta afilada y espatulados. Se encuentran estomas anomocíticos de 4 o 5 células.

En el corte transversal del tallo se evidencia la presencia de los grupos vasculares organizados en forma de anillo central como es característico de las plantas dicotiledoneas. Este anillo está conformado por tres haces vasculares bicolaterales centrados con una porción de médula reducida. Sin embargo, también se observa de forma particular para estos tallos, un segundo anillo más externo de cinco haces bicolaterales ubicado en las crestas, todos separados por capas de parénquima con presencia de fibras intervasculares y floemáticas. Este arreglo particular del tejido vascular, corresponde con lo reportado por Zocoler en 2006.

El córtex está compuesto básicamente por una sección con 4-7 capas de fibras perivasculares y una delgada capa de parénquima próxima a la epidermis.

Al realizar las tinciones, evidencia presencia de algunos granos de almidón en hojas, sin embargo son abundantes.

Con fluoroglucinol se tiñen visiblemente las paredes lignificadas de las fibras, células pétreas, y vasos conductores en los tallos.

Al realizar la tinción con sudan rojo III no se observaron coloraciones que indicaran la presencia de depósitos de aceites o resinas.

4.11 Evaluación de los frutos

Los frutos obtenidos en todos los casos observan color naranja como referencia del estado de madurez y fue el criterio de seguimiento utilizado para definir el momento de la recolección.

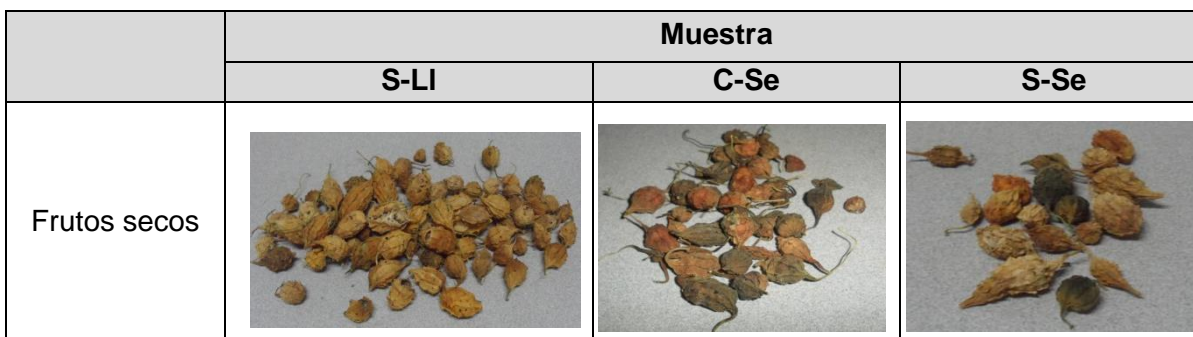


Figura 4-3. Fotografía de los frutos secos de las muestras de *Momordica charantia* L.

• DIMENSIONES DE LOS FRUTOS

Los datos de las dimensiones de todos los frutos en cada una de las muestras se encuentran en el Anexo 7-3. *Dimensiones de los frutos de Momordica charantia* L.

Muestra	S-LI		C-Se		S-Se	
Medida	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)
Promedio	18,20	12,49	15,67	10,47	16,33	10,78
Desviación estándar	5,26	2,66	3,03	2,11	5,44	2,10
Mínimo	10	8	10	5	5	7
Máximo	35	22	25	17	27	14
Rango	25,00	14,00	15,00	12,00	22,00	7,00
CV%	28,89	21,30	19,36	20,19	33,34	19,50

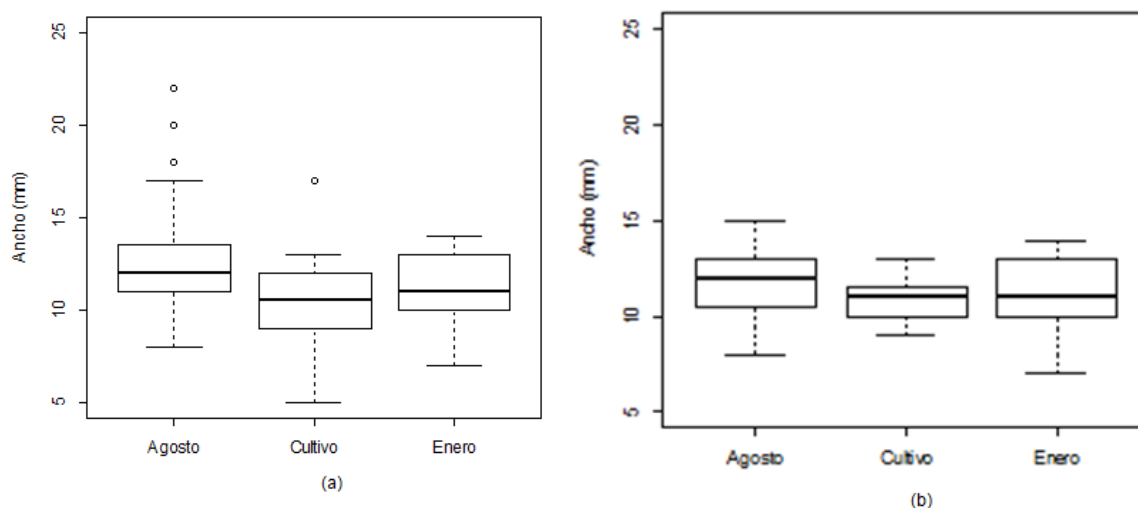
CV: coeficiente de variación

Tabla 4-21. Resultados de dimensiones de frutos de *Momordica charantia* L.

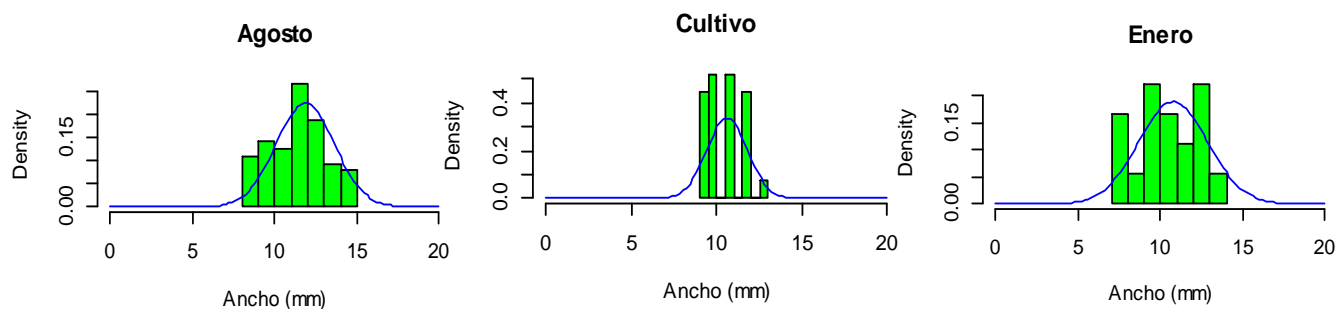
En cuanto a las dimensiones, se observa que el ancho de los frutos de todas las muestras presenta una mediana similar, y se evidencia un pequeño sesgo respecto al valor promedio que se encuentra entre 10,5 y 12,5 mm en todos los casos. Sin embargo la dispersión de los datos en todas las muestras si difiere siendo los valores de la muestra Cultivo (C-Se) más uniformes, aunque de aclarar que existen algunos datos atípicos que no se tuvieron en cuenta ya que no representaban el comportamiento de la población de frutos. A continuación se relacionan los nuevos estadísticos descriptivos descatando los valores fuera de tendencia.

Muestra	S-LI		C-Se		S-Se	
Medida	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)
Promedio	17,74	11,84	15,34	10,59	16,33	10,78
Mediana	17	12	15	11	17	11
Mínimo	10	8	10	9	5	7
Máximo	27	15	20	13	27	14

Tabla 4-22. Resultados de dimensiones de frutos de *Momordica charantia* L. descartando valores atípicos

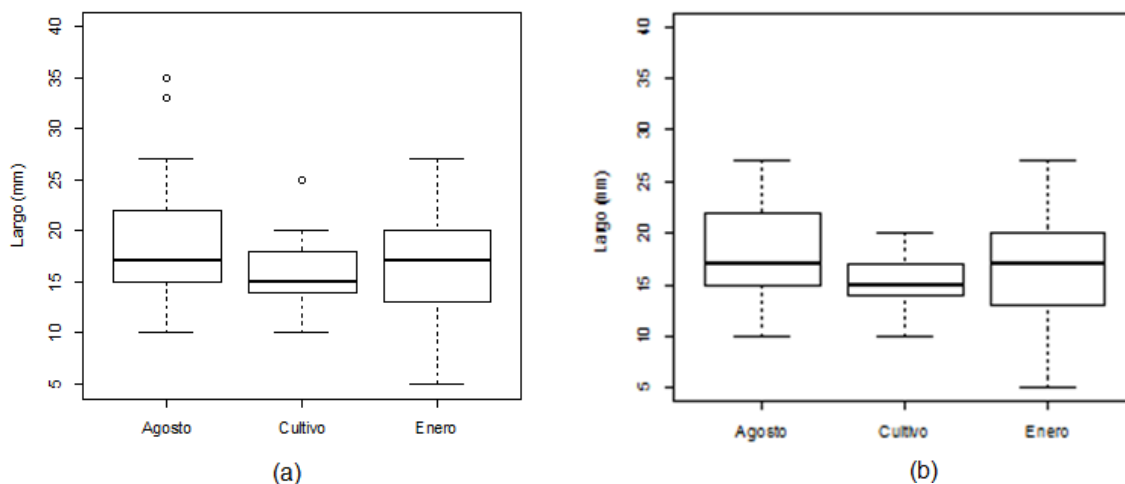


Grafica 4-6. Diagramas de cajas de la medida ancho de los frutos antes (a) y después (b) de retirar los valores atípicos

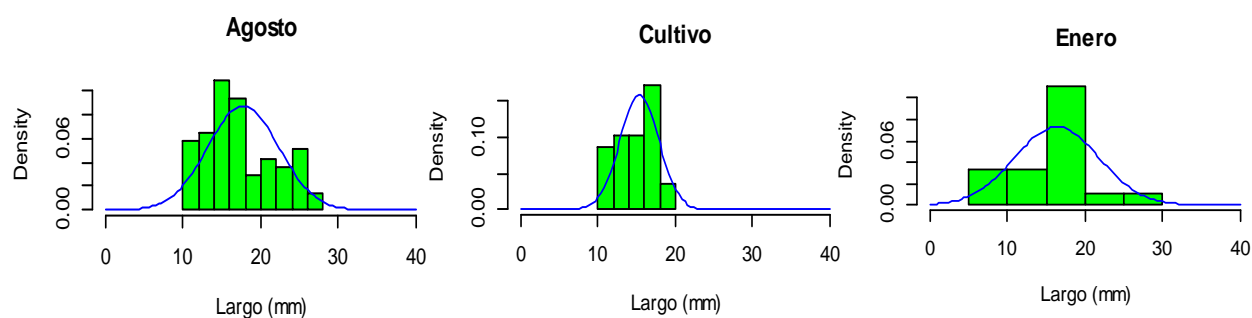


Grafica 4-7. Histograma de distribución de las medidas de ancho de los frutos

Respecto a la medida de longitud, también se evidencia un valor de mediana y promedio similares para las tres muestras aunque la dispersión de los datos es más amplia y es notable para la muestra de enero (S-Se), seguido por la muestra de agosto (S-LI) y finalizando con la muestra de cultivo (C-Se).



Grafica 4-8. Diagramas de cajas de la medida de longitud de los frutos antes (a) y después (b) de retirar los valores atípicos



Grafica 4-9. Diagramas de densidad de la medida de longitud de los frutos antes (a) y después (b) de retirar los valores atípicos

En general puede observarse que el estado de crecimiento de los frutos de cultivo representado por la homogeneidad de sus dos dimensiones, es más uniforme y controlado que de los frutos de las muestras de recolección silvestre.

4.12 Determinación de presencia de saponinas

4.12.1 Índice de espuma

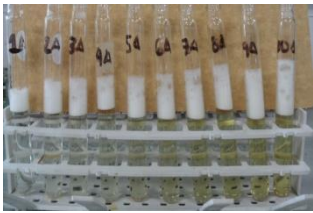
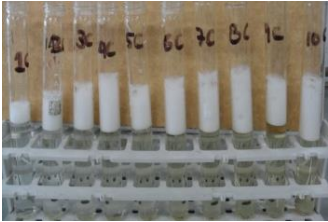
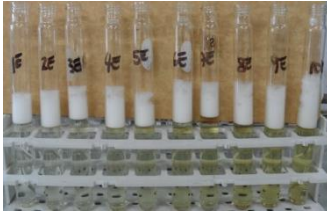
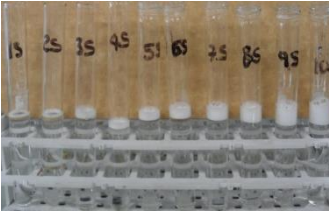
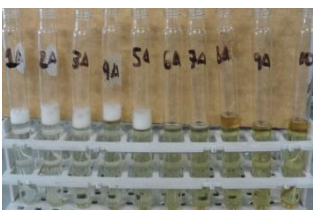
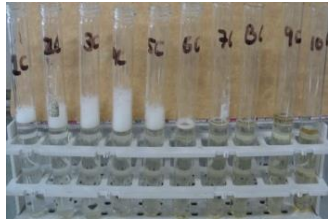
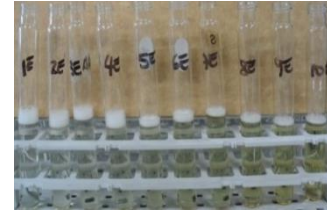
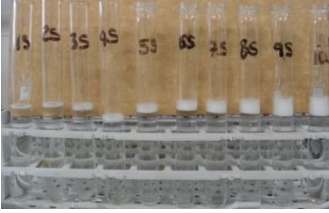
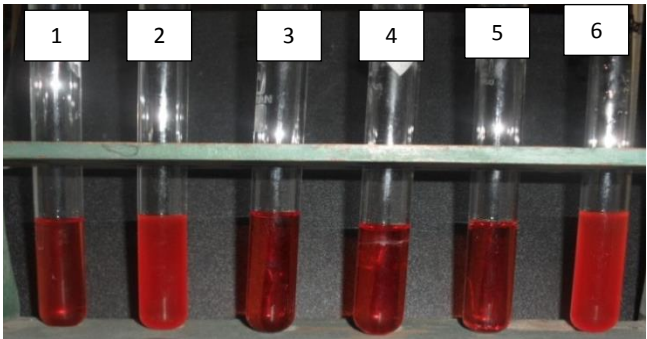
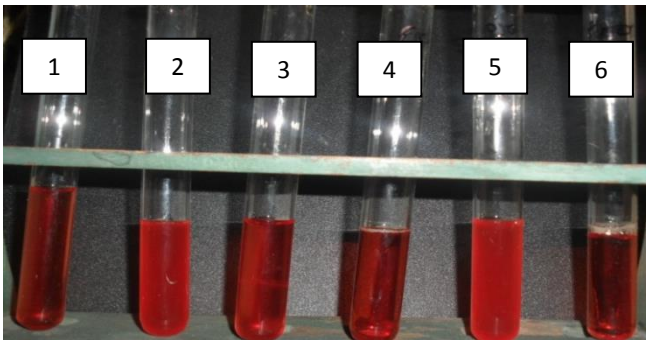
Tubo	Volumen de componentes		Altura de columna de espuma (cm)			Patrón
	Extracto (ml)	Agua (ml)	S-LI	C-Se	S-Se	Saponinas
1	1	9	1,0	1,0	1,1	0,2
2	2	8	1,5	1,4	1,0	0,2
3	3	7	1,5	2,0	0,8	0,4
4	4	6	1,2	3,0	1,2	0,4
5	5	5	1,3	0,4	0,5	0,5
6	6	4	0,1	0,2	0,5	0,7
7	7	3	0,1	<0,1	0,4	0,9
8	8	2	0,1	<0,1	0,4	1,0
9	9	1	0,1	<0,1	0,4	1,3
10	10	0	0,1	<0,1	0,3	1,5
Índice de espuma			200	250	250	1000
Foto inicial (Después de agitación)						
Foto final Después de 15 minutos de reposo						

Tabla 4-23. Resultados de altura de columna de espuma para determinación de índice de espuma en muestras de extractos de material vegetal de *Momordica charantia* L.

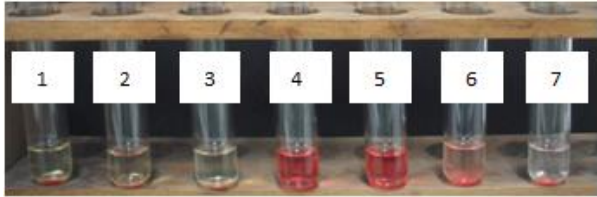
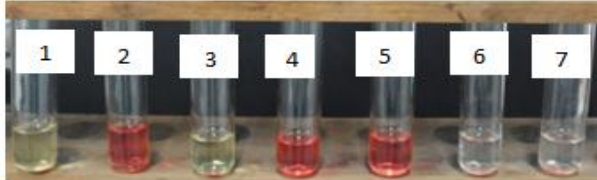
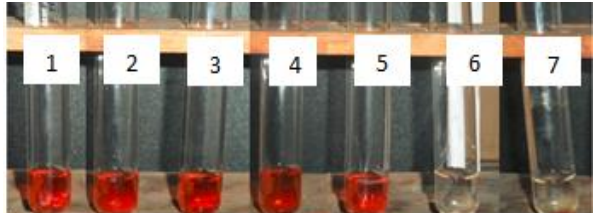

4.12.2 Determinación de la presencia de saponinas según metodología (SANABRIA, 1983)

N° Ensayo	N° Tubo	MUESTRA	RESULTADOS			Fotos
			< 10 min	10 min	> 10 min **	
1	1	Fruto S-LI	-	-	+++	
	2	S-LI	-	-	-	
	3	S-Se	-	+++	+++	
	4	C-Se	-	-	+++	
	5	Patrón*	+++	+++	+++	
	6	Blanco	-	-	-	
2	1	Fruto S-LI	-	+	+++	
	2	S-LI	-	-	-	
	3	C-Se	-	-	+++	
	4	S-Se	+++	+++	+++	
	6	Blanco	-	-	-	
	5	Patrón*	+++	+++	+++	

*El tiempo de hemólisis del patrón es inferior a un minuto** Se produce hemólisis entre 15 y 20 minutos

Tabla 4-24. Resultados hemólisis de eritrocitos para detección de saponinas en extractos de diferentes muestras de *Momordica charantia* L. utilizando el método referenciado por Sanabria

4.12.3 Determinación de presencia de Saponinas según método (OMS, 2011)

N° TUBO	1	2	3	4	5	6	7	Foto
	S-LI	S-Se	C-Se	Fruto S-LI	Patrón 1%	Patrón Buffer	Blanco	
Tubo 1	-	-	-	+	+	-	-	
Tubo 2	-	+	-	+	+	-	-	
Tubo 3	+	+	+	+	-	-	-	
Tubo 4	+	+	+	+	+	-	-	

T abla 4-25. Resultados hemólisis de eritrocitos para detección de saponinas en extractos de diferentes muestras de *Momordica charantia* L. utilizando el método referenciado por OMS.

Las pruebas cualitativas de identificación general y selectiva confirmaron la presencia de saponinas en todas las muestras.

La presencia de saponinas había sido reportada en frutos de *Momordica* (Habicht et al., 2011; Keller, 2011). Zocoler reportó presencia de saponinas en extractos de partes aéreas de la planta sin embargo, no se relaciona el método utilizado para esta determinación.

El ensayo de formación de espuma es un indicador preliminar de la presencia de saponinas, considerando la capacidad de estos compuestos de actuar como tensioactivos y permitir la incorporación de aire en una solución tras agitación. Se observó en todas las muestras la formación de espuma tal como se reportaron presentes en los extractos de *Momordica charantia* L. (Zocoler, 2006), sin embargo el comportamiento evidenciado no refleja una relación directa entre la concentración de extracto y mayor formación de espuma como se produjo con el patrón de saponinas. Podría inferirse que al aumentar la concentración de extracto también se incrementa la presencia de compuestos con actividad antiespumante.

Teniendo en cuenta que la máxima altura de la columna de espuma se evidenció en la dilución 4 o 5 de cada extracto, con base en esta se calculó el índice de espuma el cual refleja que la muestra C-Se y S-Se tienen mayor contenido de saponinas que la muestra S-LI. El índice de espuma encontrado es superior al reportado en otro estudio donde se indica que para *Momordica charantia* L. es menor a 100 (Zocoler, 2006) y difiere del resultado negativo reportado por (Andrade et al., 2012).

En cuanto a la prueba de hemólisis confirmatoria de la presencia de saponinas, se realizó por el método de Sanabria y OMS en ensayo preliminar ya que no se contaba con el estándar de referencia de saponinas R.

El extracto utilizado de cada muestra fue similar y la diferencia estuvo dada por la preparación de muestra de eritrocitos y la preparación de la mezclas para establecer la hemólisis. Se evidenció que el método de Sanabria es menos sensible que el método OMS, ya que este último permite manejar un rango de concentraciones de extracto e identificar la presencia de saponinas aun en concentraciones bajas.

Para el caso de las muestras evaluadas de *Momordica charantia* L. Según el método de Sanabria en todas las muestras se evidenció hemólisis excepto la muestra S-LI después de 10 minutos de reposo. Sin embargo, el análisis del fruto de esta misma muestra si evidenció la presencia de saponinas como se reporta por Habicht et al., 2001 y por Keller, 2011.

Para el caso del método OMS, se evidenció hemólisis en todas las muestras pero se confirma que se requiere mayor concentración de extracto de la muestra S-LI para producir hemólisis similar.

De ambos métodos pueden obtenerse resultados similares, sin embargo se percibió el método de OMS más sensible. Adicionalmente se evidenció que no fue necesaria la etapa de cetrifugación sugerida en el método de Sanabria para obtener el mismo resultado en la prueba con el otro método, ya que se utiliza una solución bufferizada de eritrocitos directamente para reacción. Sin embargo tambien resulta demorado para obtener el resultado, ya que requiere un tiempo de reposo para la lectura de hemólisis de 6 horas, mientras que método de Sanabria solo requiere 10 minutos de reacción después de preparar las mezclas de extracto con suspensión de eritrocitos.

4.13 Cenizas totales

El contenido de cenizas totales se reporta como porcentaje de cenizas respecto a la cantidad de material vegetal pesado.

Material	% Cenizas totales	Promedio	Desviación estándar	CV %	IC*
S-LI-1	9,91	9,92	0,127	1,28	9,92± 0,324
S-LI-2	9,80				
S-LI-3	10,06				
C-Se-1	9,55	9,34	0,179	1,91	9,34± 0,447
C-Se-2	9,26				
C-Se-3	9,22				
S-Se-1	11,86	11,96	0,174	1,45	11,96± 0,438
S-Se-2	12,16				
S-Se-3	11,85				

CV%: coeficiente de variación.
Intervalo de confianza $t \alpha 0,05$ 2GL= 4,3027

Tabla 4-26. Resultados de cenizas totales en muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L.

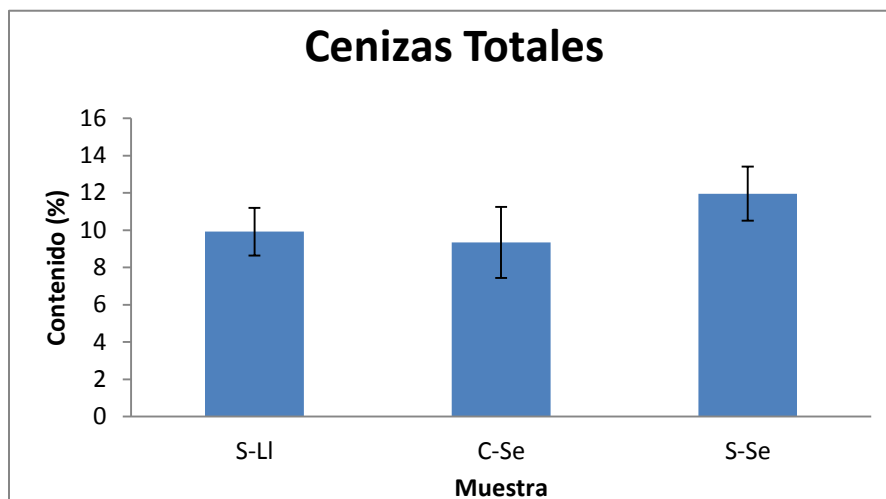


Grafico 4-10. Comparación de resultados de porcentaje de cenizas totales para las muestras de recolección silvestre y de cultivo

Las cenizas reflejan el contenido de sales y óxidos inorgánicos provenientes de material extraño y el producido del tejido vegetal como parte de su metabolismo. Se observa que la cantidad de cenizas totales para las tres muestras presenta una diferencia significativa tanto de las medias y de varianzas de las muestras; teniendo en cuenta que se manipularon y almacenaron las muestras de forma similar, esta diferencia se puede atribuir al terreno y condiciones del entorno de cada muestra. La diferencia observada en las muestras de colecta silvestre de diferente época puede atribuirse a que en la muestra de época seca, se concentran los minerales incrementando el contenido total.

Sin embargo, es de resaltar que los valores obtenidos se encuentran dentro los rangos referenciados en monografías de material vegetal de hierbas u hojas en las farmacopeas brasilera, británica y japonesa donde el límite máximo de cenizas totales oscila entre 5-22%.

4.14 Cenizas insolubles en ácido

Muestra	% Cenizas insoluble en ácido	Promedio	Desviación estándar	CV %	IC $\alpha 0,05 / 2GL$
S-LI-1	0,424	0,50	0,068	13,594	0,50±0,169
S-LI-2	0,513				
S-LI-3	0,558				
C-Se-1	1,055	0,91	0,128	14,106	0,91±0,318
C-Se-2	0,810				
C-Se-3	0,867				
S-Se-1	0,258	0,35	0,092	26,161	0,35±0,230
S-Se-2	0,443				
S-Se-3	0,360				

CV: Coeficiente de variación
Intervalo de confianza $t \alpha 0,05$ 2GL= 4,3027

Tabla 4-27. Resultados de cenizas insolubles en ácido en muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L.

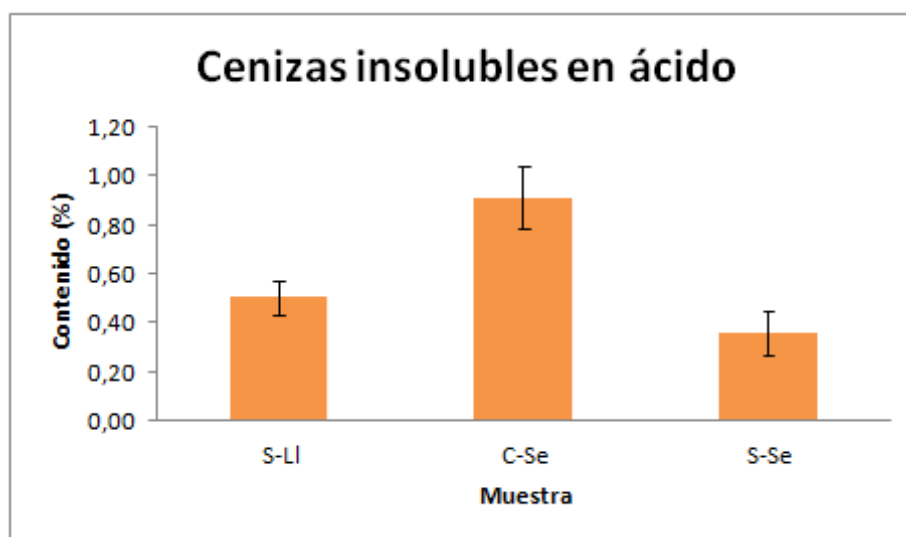


Grafico 4-11. Comparación de resultados de porcentaje de cenizas insolubles en ácido para las muestras de recolección silvestre y de cultivo

Los resultados de cenizas insolubles en ácido son estadísticamente diferentes para el cultivo respecto a las muestras de recolección silvestre, lo cual está asociado a la diferencia de medias. La dispersión de los datos de cada muestra no es estadísticamente diferente. Sin embargo, al comparar con límites reportados de drogas similares 0,4-6,0%, los valores de todas las muestras *Momordica charantia* L. son muy inferiores. Teniendo en cuenta que el contenido de quelatos y silicatos es aportado básicamente por arena y residuos del suelo, podría inferirse que las muestras de material vegetal fueron manipuladas adecuadamente desde la recolección hasta el almacenamiento; probablemente la diferencia percibida para el cultivo proviene de las características del suelo.

4.15 Análisis microbiológico

Muestra	RTV (ufc/g)	Hongos (ufc/g)	Enterobacterias (ufc/g)
S-LI-1	151×10^5	28×10^3	110×10^4
S-LI-2	280×10^5	46×10^3	74×10^4
C-Se-1	263×10^4	95×10^3	12×10^3
C-Se-2	298×10^4	127×10^3	34×10^3
S-Se-1	240×10^4	71×10^3	66×10^3

RTV: Recuento total de microorganismos viables/ **UFC/g:** unidades formadoras de colonia por cada gramo de material vegetal

Tabla 4-28. Resultados recuentos de Microorganismos en muestras de *Momordica charantia* L.

Teniendo en cuenta la fuente de obtención del material, es de esperarse la presencia de algunos microorganismos, que si bien es cierto, no deberían estar presentes en materias

primas que van a ser destinadas a la producción de medicamentos, se ha definido en los diferentes estándares que es permisible la presencia de mayores recuentos cuando la droga va a ser sometido a un tratamiento térmico o químico posterior. Adicional a esto, la carga microbiológica, se pueden reducir mediante implementación de actividades durante la recolección, poscosecha y tratamientos previos a su utilización en la fabricación de productos fitoterapéuticos.

Se realizaron los recuentos de microorganismos aerobios totales, hongos y enterobacterias, evidenciando que los valores obtenidos para las muestras son aceptables y se encuentran dentro de los rangos establecidos por farmacopeas y la OMS (Ver Anexo7-4. *Especificaciones de referencia para recuentos y presencia de microorganismos patógenos en muestras de material vegetal*). Sin embargo, se ajustan a la especificación para materiales vegetales que tendrán un procesamiento posterior a través procesos de extracción por digestión o utilizando solventes, que permita reducir la carga microbiológica en el producto fitoterapéutico final.

Por otra parte estos recuentos sugieren, a pesar de asegurar que el material ha sido manipulado adecuadamente, que es recomendable un proceso de descontaminación previo al proceso de secado que permita reducir el nivel de microorganismos sin afectar el contenido de metabolitos secundarios, tal como remoción de tierra, lavado a presión, entre otros.

En general las muestras evidencian una carga microbiológica aceptable y similar, aunque la muestra de recolección silvestre correspondiente a la época seca refleja recuentos menores. De esta manera puede inferirse que realizar el proceso de secado de forma inmediata a la recolección dado el contenido de agua de las partes aéreas es fundamental para limitar la proliferación microbiana. De igual manera el material vegetal entero y molido debe protegerse de la humedad y la contaminación ambiental para garantizar su preservación.

El aislamiento e identificación de microorganismos patógenos dio como resultado que la muestra de material vegetal de cultivo se encuentra más contaminada que las muestras de recolección silvestre. Las pruebas bioquímicas evidencian una posible contaminación con *Salmonella* para las muestras de cultivo y *Bacillus cereus* para todas las muestras. La

Salmonella en un material vegetal podría estar asociada a la presencia de animales en el terreno de cultivo los cuales pueden contaminar las aguas de riego a través de las heces. Es importante aclarar que el material vegetal con presencia de microorganismos patógenos no sería apto para el uso en productos fitotrapéuticos, por esto la importancia de esta caracterización que permite identificar los riesgos y establecer medidas para el mejoramiento de la condición de cultivo, durante la recolección y la calidad del agua utilizada en la granja experimental de la sede Palmira. Para este material es importante hacer un seguimiento microbiológico caracterizando tanto los extractos intermedios y preparaciones finales del material vegetal en estudios posteriores.

A continuación se resumen los resultados de las pruebas de aislamiento e identificación de microorganismos patógenos. Los resultados de las pruebas bioquímicas para identificación de *Salmonella* y *Bacillus cereus* se encuentran relacionados en el Anexo 7-5. *Resultados de recuentos y presencia de microorganismos patógenos en muestras de material vegetal de Momordica charantia L.*

Muestra	<i>E.Coli</i> Enterobacterias	<i>Salmonella</i>	<i>Pseudomona</i> <i>spp</i>	<i>Bacillus</i> <i>cereus</i>	<i>Clostridium</i>	<i>Staphylococcus</i> <i>aureus</i>
S-LI-1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia
S-LI-2	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia
C-Se-1	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia
C-Se-2	Ausencia	Presencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia
S-Se-1	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Presencia	Ausencia	Ausencia

Tabla 4-29. Resultados aislamiento e identificación de microorganismos patógenos en muestras de *Momordica charantia L.*

4.16 Pruebas de detección de metabolitos secundarios

• Identificación de los extractos

Muestra	Clave
Extracto acuoso de material vegetal silvestre colectado en época lluviosa (Agosto /2012) de material fino	EA-S-LI-F
Extracto acuoso de material vegetal silvestre colectado en época lluviosa (Agosto /2012) de material grueso	EA-S-LI-G
Extracto acuoso de material vegetal de cultivo colectado en época Seca (Diciembre/2012) de material fino	EA-C-Se-F
Extracto acuoso de material vegetal de cultivo colectado en época Seca (Diciembre /2012) de material grueso	EA-C-Se-G
Extracto acuoso de material vegetal silvestre colectado en época Seca (Enero/2013) de material fino	EA-S-Se-F
Extracto acuoso de material vegetal silvestre colectado en época Seca (Enero/2013) de material grueso	EA-S-Se-G
Extracto Hidroalcohólico (Agua/Etanol 50:50) de material vegetal silvestre colectado en época lluviosa (Agosto /2012) de material fino	EHA-S-LI-F
Extracto Hidroalcohólico (Agua/Etanol 50:50) de material vegetal silvestre colectado en época lluviosa (Agosto /2012) de material grueso.	EHA-S-LI-G
Extracto Hidroalcohólico (Agua/Etanol 50:50) de material vegetal de cultivo colectado en época Seca (Diciembre/2012) de material fino.	EHA-C-Se-F
Extracto Hidroalcohólico (Agua/Etanol 50:50) de material vegetal de cultivo colectado en época Seca (Diciembre/2012) de material grueso.	EHA-C-Se-G
Extracto Hidroalcohólico (Agua/Etanol 50:50) de material vegetal silvestre colectado en época Seca (Enero/2013) de material fino.	EHA-S-Se-F
Extracto Hidroalcohólico (Agua/Etanol 50:50) de material vegetal silvestre colectado en época Seca (Enero/2013) de material grueso	EHA-S-Se-G
Extracto Etanólico de material vegetal silvestre colectado en época lluviosa (Agosto /2012) de material fino	EE-S-LI-F
Extracto Etanólico de material vegetal silvestre colectado en época lluviosa (Agosto /2012) de material grueso	EE-S-LI-G
Extracto Etanólico de material vegetal de cultivo colectado en época Seca (Diciembre/2012) de material fino	EE-C-Se-F
Extracto Etanólico de material vegetal de cultivo colectado en época Seca (Diciembre/2012) de material grueso	EE-C-Se-G
Extracto Etanólico de material vegetal silvestre colectado en época Seca (Enero/2013) de material fino	EE-S-Se-F
Extracto Etanólico de material vegetal silvestre colectado en época Seca (Enero/2013) de material grueso	EE-S-Se-G
Extracto Hidroalcohólico de frutos de material vegetal silvestre colectado en época lluviosa (Agosto/2012) de material molido.	EHA-S-LI-Fr
Extracto Hidroalcohólico de frutos de material vegetal de cultivo colectado en época seca (Diciembre/2012) de material molido.	EHA-C-Se-Fr
Extracto Hidroalcohólico de frutos de material vegetal silvestre colectado en época seca (Enero /2013) de material molido.	EHA-S-Se-Fr

Tabla 4-30. Identificación de los extractos de material vegetal de *Momordica charantia* L.

4.16.1 Alcaloides

Se realizaron las pruebas de precipitación utilizando los reactivos metálicos para

formación de complejos coloreados tras la presencia de alcaloides. Los resultados fueron negativos para todas las muestras y positivos para los patrones; lo anterior permite inferir la ausencia de estos metabolitos secundarios en la planta, o que la presencia es muy baja por lo que no puede ser detectado dada la sensibilidad de las pruebas cualitativas. Por esta razón se confirma el resultado con el análisis de cromatografía en capa delgada que tiene mayor sensibilidad.



Resultado negativo MC



Blanco



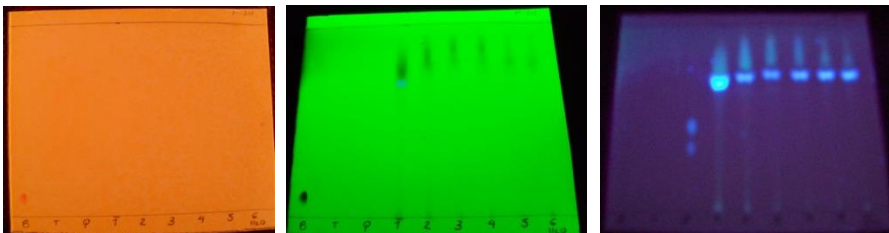
Patrón Brucina

Reactivo Muestra	Dragendorff	Mayer	Valser	Reineckato de amonio
Criterio de respuesta	(-) No turbidez ni precipitado (+) turbidez (++) Precipitado naranja (+++) precipitado naranja abundante	(-) No turbidez ni precipitado (+) turbidez (++) Precipitado Crema (+++) precipitado crema abundante	(-) No turbidez ni precipitado (+) turbidez (++) Precipitado Crema (+++) precipitado crema abundante	(-) No turbidez ni precipitado (+) turbidez (++) Precipitado Crema (+++) precipitado crema abundante
EA-S-LI-F	(-)	(-)	(-)	(-)
EA-S-LI-G	(-)	(-)	(-)	(-)
EA-C-Se-F	(-)	(-)	(-)	(-)
EA-C-Se-G	(-)	(-)	(-)	(-)
EA-S-Se-F	(-)	(-)	(-)	(-)
EA-S-Se-G	(-)	(-)	(-)	(-)
EHA-S-LI-F	(-)	(-)	(-)	(-)
EHA-S-LI-G	(-)	(-)	(-)	(-)
EHA-C-Se-F	(-)	(-)	(-)	(-)
EHA-C-Se-G	(-)	(-)	(-)	(-)
EHA-S-Se-F	(-)	(-)	(-)	(-)
EHA-S-Se-G	(-)	(-)	(-)	(-)
EE-S-LI-F	(-)	(-)	(-)	(-)
EE-S-LI-G	(-)	(-)	(-)	(-)
EE-C-Se-F	(-)	(-)	(-)	(-)
EE-C-Se-G	(-)	(-)	(-)	(-)
EE-S-Se-F	(-)	(-)	(-)	(-)
EE-S-Se-G	(-)	(-)	(-)	(-)
Patron Brucina	+++	+++	+++	+++
Patron Quinina	+++	+++	+++	+++
Blanco	(-)	(-)	(-)	(-)

Tabla 4-31. Resultados de pruebas de detección cualitativa de alcaloides en extractos de *Momordica charantia* L.

Se evaluaron 4 fases móviles de acuerdo con lo reportado como mezclas solventes con diferente polaridad para screening (Wagner, 1984) y los reportes de estudios preliminares. La mezcla Metanol:Amoníaco (99:1) fue la que permitió mayor desplazamiento y separación de algunos compuestos presentes en las muestras. Se utilizaron como patrones los alcaloides brucina y quinina los cuales habían arrojado resultados positivos en las pruebas químicas de precipitación, en CCD evidenciaron fluorescencia bajo luz UV 365 nm y manchas color naranja en luz visible tras revelar con reactivo de Dragendorff.

A pesar de que todas las muestras de extracto no reaccionaron frente al reactivo de Dragendorff confirmando la ausencia de alcaloides, si evidenciaron la presencia de algunos compuestos fluorescentes localizados en los Rf relacionados en las tablas 4-32, 4-33, 4-34 y 4-35. En los extractos con diferente solvente se observan las mismas manchas, sin embargo el extracto etanólico revela la presencia de compuestos adicionales y de clorofilas. Estas últimas son insolubles en agua y pueden extraerse con solventes como etanol dada su estructura compleja, se perciben como manchas que fluorescen rojo a la luz UV como ha sido reportado previamente (Avalos, 2008). En el extracto hidroalcohólico se puede observar que las sustancias fluorescentes tienen manchas de menor intensidad para las muestras de recolección silvestre - época lluviosa- tamaño grueso y la muestra de recolección silvestre-época seca-tamaño fino que podría relacionarse con la cantidad de extracto aplicado en la placa.

Extracto	Patrón		Muestra					
Acuoso	Brucina	Quinina	EA-S-LI-F	EA-S-LI-G	EA-C-Se-F	EA-C-Se-G	EA-S-Se-F	EA-S-Se-G
Visible – Revelado con Dragendorff	0,12	0,54	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela
365 nm	ND	0,54 0,48	0,72 fluorescencia azul para todas las muestras, mas intensa para la muestra EA-S-LL-F					
Placa CCD después de reveler con Dragendorff								
	Visible		UV -254nm		UV-365 nm			

ND: no detectado

Tabla 4-32. Resultados Rf de CCD para alcaloides en extractos acuosos

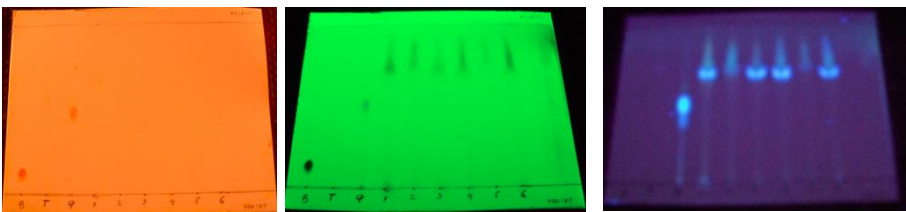
Extracto	Patrón		Muestra					
<i>Hidroalcohólico</i>	Brucina	Quinina	EHA-S-LI-F	EHA-S-LI-G	EHA-C-Se-F	EHA-C-Se-G	EHA-S-Se-F	EHA-S-Se-G
<i>Visible – Revelado con Dragendorff</i>	0,11	0,49	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela
<i>365 nm</i>	ND	0,49 0,44	0,73 fluorescencia azul para todas las muestras					
<i>Placa CCD después de reveler con Dragendorff</i>								
	Visible		UV -254 nm			UV-365 nm		

Tabla 4-33. Resultados Rf de CCD para alcaloides en extractos hidroalcohólicos

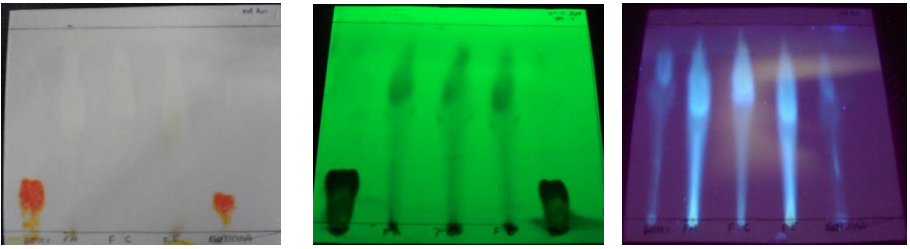
Extracto Frutos	Patrón	Muestra		
<i>Hidroalcohólico</i>	Brucina	EHA-C-Se-Fr	EHA-C-Se-Fr	EHA-S-Se-Fr
<i>Visible –con Dragendorff</i>	0,14	No revela	No revela	No revela
<i>365 nm</i>	0,80	0,60	0,70	0,60
<i>Placa CCD después de revelar con Dragendorff</i>				
	Visible	254 nm		365 nm

Tabla 4-34. Resultados Rf de CCD para alcaloides en extractos hidroalcohólicos de frutos

En el extracto hidroalcohólico tampoco se evidenció la presencia de alcaloides al revelar la placa con el reactivo de Dragendorff. Se evidencia en luz ultravioleta de longitud de onda corta y larga la presencia de compuestos con Rf similar al obtenido en la cromatografía de los extractos de partes aéreas.

Extracto	Patrón		Muestra					
<i>Etanólico</i>	Brucina	Quinina	EE-S-LI-F	EE-S-LI-G	EE-C-Se-F	EE-C-Se-G	EE-S-Se-F	EE-S-Se-G
Visible – Revelado con Dragendorff	0,12	0,54	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela
365 nm	ND	0,54 0,52	0,7 0,62 (clorofilas)	0,70 0,62 (clorofilas) 0,52	0,70 0,62 (clorofilas) 0,52	0,70 0,62 (clorofilas)	0,70 0,62 (clorofilas)	0,70 0,62 (clorofilas)
Placa CCD después de reveler con Dragendorff	<div style="display: flex; justify-content: space-around; margin-top: 5px;"> Visible UV -254 nm UV-365 nm </div>							

Tabla 4-35. Resultados Rf de CCD para alcaloides en extractos etanólicos

La presencia de alcaloides en la planta no está del todo establecida ya que existen algunos reportes previos de la literatura donde se menciona la presencia de alcaloides no caracterizados en partes aéreas (Andrade, 2012; Mikaelle, 2010; Raman y Lau, 1996) y los alcaloides zeatina y vicina en semillas de los frutos (Taylor, 2002; Patil y Patil, 2011). Sin embargo existen otros donde se confirma la ausencia de este metabolito (Zocoler, 2006).

Es importante aclarar que en algunos de los estudios donde se ha confirmado la presencia alcaloides se ha utilizado la metodología de detección cualitativa con reactivos metalicos, pero los resultados del análisis de cromatografía en capa delgada han sido negativos siendo este un análisis más sensible y selectivo. En otros estudios (Patil y Patil, 2011) se ha confirmado la presencia de alcaloides en extractos clorofórmicos y etanólicos de las semillas. Lo anterior nos permite inferir que las conclusiones respecto a la presencia de estos metabolitos que se han reportado, podrían variar de acuerdo a factores asociados al solvente de extracción, cantidad de material vegetal de partida, y a factores relacionados con el material vegetal como fuente geográfica, órganos de la planta utilizados, entre otros, que en algunos casos no están claramente descritos en los estudios y no permiten conocer si los resultados son totalmente comparables. Para este caso, el extracto de los frutos con semillas no arrojó resultados positivos para la presencia de alcaloides posiblemente por la concentración del extracto usado y no se limitó al uso de las semillas.

4.16.2 Flavonoides y compuestos fenólicos.

Muestra		Patron	EA-S-LI-F	EA-S-LI-G	EA-C-Se-F	EA-C-Se-G	EA-S-Se-F	EA-S-Se-G	EHA-S-LI-F	EHA-S-LI-G	EHA-C-Se-F	EHA-C-Se-G	EHA-S-Se-F	EHA-S-Se-G	EE-S-LI-F	EE-S-LI-G	EE-C-Se-F	EE-C-Se-G	EE-S-Se-F	EE-S-Se-G	Blanco
Fase AE	Cloruro Férrico	+++	+++	++	+++	++	++	+++	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	++	-
	HCl/Δ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Shinoda	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fase B	Cloruro Férrico	+++	-	+	+	++	+	++	+	++	+++	++	++	++	+	++	++	++	++	++	-
	HCl/Δ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Shinoda	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(AE) Acetato de Etilo. (B) Butanólica

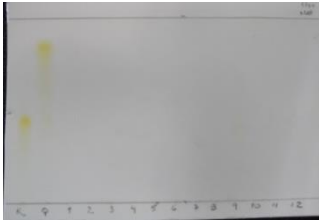
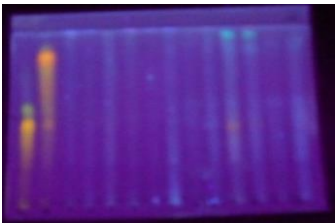
Tabla 4-36. Resultados pruebas coloración para flavonoides y compuestos fenólicos para las fases AE y B

Dada las coloraciones verdes, cafes y negras después de la reacción con cloruro férrico, se confirma la presencia de compuestos fenólicos en todas las muestras. Comparando la fase Butanólica y de acetato de etilo, se encuentran en mayor proporción en la fase butanólica dada por la intensidad de las coloraciones, lo cual permite inferir que los compuestos fenólicos son de alta polaridad o se encuentran glicosilados.

Según reportes previos, *Momordica charantia* L. arrojó resultados positivos con cloruro férrico y al realizar pruebas específicas, se confirmó la presencia de catequinas y ausencia de taninos (Rodrigues et al., 2010).

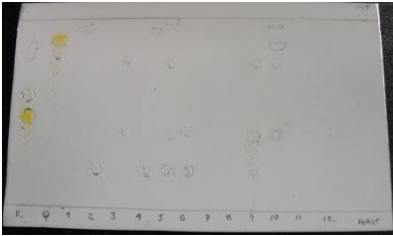
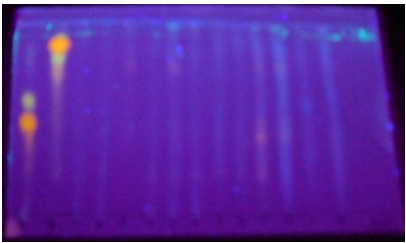
La prueba de Shinoda para flavonoides fue negativa en todos los casos al igual que la prueba con Ácido clorhídrico para Leucoantocinánidas. Estos resultados no son consistentes con respecto a reportes previos donde se encontraba una cantidad significativa de flavonoides e incluso fueron definidos como marcadores químicos para controlar la calidad de extractos estandarizados (Nobre, 2005).

Al comparar los resultados para las 3 muestras en CCD en extractos con realizados con los tres solventes (Tablas 4-37, 4-38, 4-39- 4-40), se observan unas ligeras manchas amarillas en la muestra de cultivo pero en el espectro visible no son percibidas, por lo cual no se toma en cuenta como una diferencia contundente respecto a las muestras de recolección silvestre de ninguna de las épocas de recolección.

Extracto	Patrón		Muestra											
			Muestras Fase acetato de etilo						Muestras Fase butanólica					
<i>Acuoso</i>	Rutina	Quercetina	EA-S-LI-F	EA-S-LI-G	EA-C-Se-F	EA-C-Se-G	EA-S-Se-F	EA-S-Se-G	EA-S-LI-F	EA-S-LI-G	EA-C-Se-F	EA-C-Se-G	EA-S-Se-F	EA-S-Se-G
<i>Visible – Revelado con NP</i>	0,44	0,82	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>365 nm</i>	0,54 0,44	0,82 0,44	V	V	V	V	V	V	V	V	0,4	V	V	V
<i>Placa CCD Revelado NP/PEG</i>														
														
			Visible						UV-365 nm					

V= varios compuestos

Tabla 4-37. Resultados de CCD para flavonoides en extractos acuosos

Extracto	Patrón		Muestra											
			Muestras Fase acetato de etilo						Muestras Fase butanólica					
<i>Hidroalcohólico</i>	Rutina	Quercetina	EHA-S-LI-F	EHA-S-LI-G	EHA-C-Se-F	EHA-C-Se-G	EHA-S-Se-F	EHA-S-Se-G	EHA-S-LI-F	EHA-S-LI-G	EHA-C-Se-F	EHA-C-Se-G	EHA-S-Se-F	EHA-S-Se-G
<i>Visible – Revelado NP/PEG</i>	0,46	0,86	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
<i>365 nm</i>	0,80 0,56 0,46	0,86 0,80 0,76	V	0,2	0,38 0,76	0,2	0,20 0,38 0,76	0,20 0,38	V	V	0,38 0,76	0,38 0,76	V	V
<i>Placa CCD Revelado NP/PEG</i>														
														
			Visible						UV-365 nm					

V= varios compuestos

Tabla 4-38. Resultados de CCD para flavonoides en extractos hidroalcohólicos

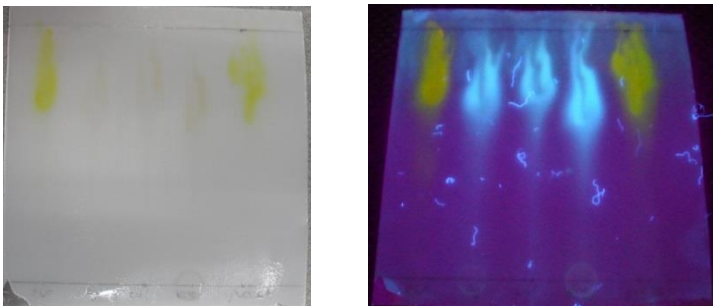
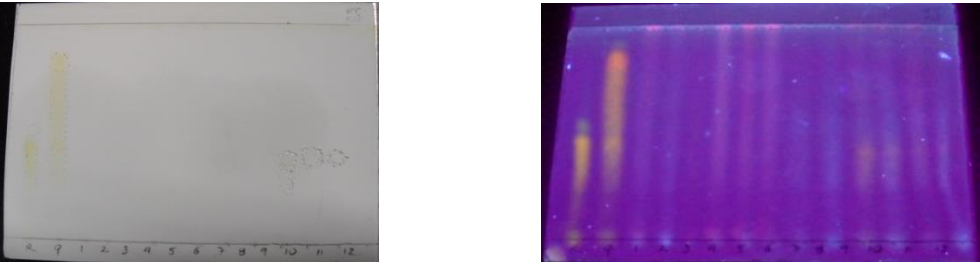
Extracto Frutos	Patrón	Muestra		
Hidroalcohólico	Quercetina	EHA-C-Se-Fr	EHA-C-Se-Fr	EHA-S-Se-Fr
Visible –NP/PEG	0,80	Varios	varios	Varios
365 nm	0,80	0,80	0,80	0,78
Placa CCD				
	Visible		365 nm	

Tabla 4-39. Resultados de CCD para flavonoides en extractos hidroalcohólicos de frutos

En la CCD de los extractos hidroalcohólicos de los frutos (Tabla 4-38), se evidencia la presencia de unos compuestos con fluorescencia de alta intensidad de la misma forma para las muestras d recolección silvestre y cultivo, en Rf diferentes a los mostrados en la CCD de partes aéreas. Al revelar con reactivo NP/PEG se evidencian manchas amarillas en luz visible y en luz UV 365 nm solamente para el patrón, lo cual refleja la ausencia de flavonoides o que se encuentran en baja concentración que no permiten su detección. Se observa hay fluorescencia azul indicativo de ácidos fenólicos.

Extracto	Patrón		Muestra											
			Muestras Fase Acetato de Etilo						Muestras Fase Butanólica					
Etanolico	Rutina	Quercetina	EE-S-LI-F	EE-S-LI-G	EE-C-Se-F	EE-C-Se-G	EE-S-Se-F	EE-S-Se-G	EE-S-LI-F	EE-S-LI-G	EE-C-Se-F	EE-C-Se-G	EE-S-Se-F	EE-S-Se-G
			EE-S-LI-F	EE-S-LI-G	EE-C-Se-F	EE-C-Se-G	EE-S-Se-F	EE-S-Se-G	EE-S-LI-F	EE-S-LI-G	EE-C-Se-F	EE-C-Se-G	EE-S-Se-F	EE-S-Se-G
Visible – Revelado con NP	0,46	0,84	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
365 nm	0,50 0,44	0,84 0,44	V	V	V	0,38	0,38	0,38	V	V	V	0,38	0,38	0,38
Placa CCD revelada con NP														
	Visible							UV-365 nm						

V= varios compuestos

Tabla 4-40. Resultados de CCD para flavonoides en extractos etanólicos

De acuerdo a los resultados de la CCD, se evidencia que existe la presencia de flavonoides en las muestras de *Momordica charantia* L., sin embargo la concentración asociada a la intensidad de las manchas reveladas con reactivo NP, indica por la fluorescencia azul, hay presencia de ácidos fenólicos, y que la concentración de flavonoides es baja tanto en la fase butanólica como en la de acetato de etilo. Lo anterior es consistente con los valores cuantificados de fenoles totales, como se mencionara mas adelante.

Es importante resaltar que aunque se ha reportado en la literatura la cuantificación de flavonoides reportados como quercetina (Nobre, 2005), no se han caracterizado las fracciones ricas en estos compuestos.

Previamente había sido reportado en la farmacopea vegetal caribeña la presencia de compuestos fenólicos y flavonoides, así como Zocoler en 2006. Sin embargo, Andrade en 2012 y Beltrán en 2013 reportaron la ausencia, siendo el primero a través de pruebas químicas cualitativas en tubo y CCD, y el último solo a través de pruebas cualitativas de coloración. Es importante mencionar que esta variabilidad de los reportes existentes podría atribuirse en parte a condiciones del análisis, la zona de recolección del material o proceso de extracción entre otras. Para el estudio de Beltrán en 2013, se utilizó material vegetal de la costa Atlántica y el extracto se obtuvo por maceración en frío con etanol al 98% (Beltrán, Díaz y Gomez, 2013).

4.16.3 Compuestos Antracénicos

Los reportes previos (Rodríguez, 2010; Zocoler, 2006) indican la ausencia de este grupo de metabolitos para *Momordica charantia* L., sin embargo se realizó para este estudio como parte de la caracterización de las muestras. Normalmente estos compuestos se han reportado para familias Rhamnaceae (cáscara sagrada y frágula), Polygonaceae (Ruibarbo), Leguminosae (hojas y frutos de sen) y Liliaceae (aloe o sábila), pero no para la familia Cucurbitaceae.

Se realizó la CCD para compuestos antracénicos utilizando como fase móvil la mezcla Tolueno: Acetato de etilo: Ácido acético (75:24:1) para las soluciones A y B donde se pretendía detectar compuestos antracénicos en su forma natural en la planta y posterior a una proceso de oxidación con peróxido. Se confirmó que no hay presencia de compuestos antracénicos ya que no se observó fluorescencia de color amarillo, rojo o café después de revelar las placas de CCD (Tablas 4-42, 4-43 y 4-44).

COMPUESTOS ANTRACÉNICOS

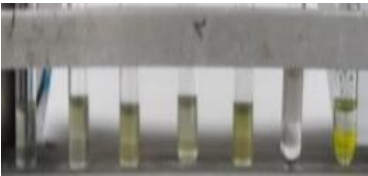

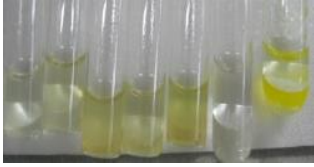






Prueba de tubo- Compuestos Antracénicos						
Solucion B						
Tiempo	0 minutos		10 minutos		30 minutos	
Muestra	Resultado	Foto	Resultado	Foto	Resultado	foto
EA-S-LI-F	Negativo		Negativo		Negativo	
EA-S-LI-G						
EA-C-Se-F						
EA-C-Se-G						
EA-S-Se-F						
EA-S-Se-G						
EHA-S-LI-F	Negativo		Negativo		Negativo	
EHA-S-LI-G						
EHA-C-Se-F						
EHA-C-Se-G						
EHA-S-Se-F						
EHA-S-Se-G						
EE-S-LI-F	Negativo		Negativo		Negativo	
EE-S-LI-G						
EE-C-Se-F						
EE-C-Se-G						
EE-S-Se-F						
EE-S-Se-G						

Tabla 4-41. Resultados de pruebas de detección cualitativas para compuestos antracénicos

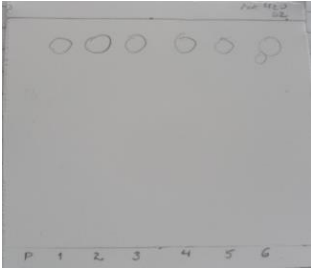
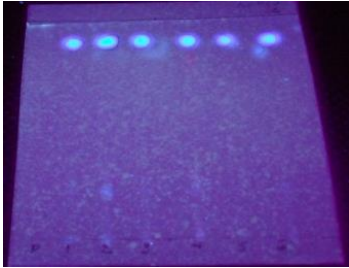
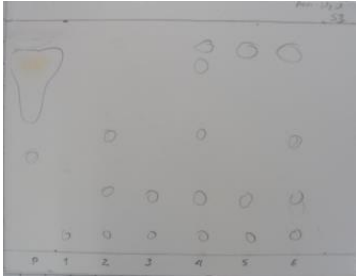
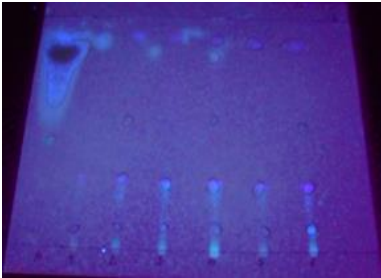
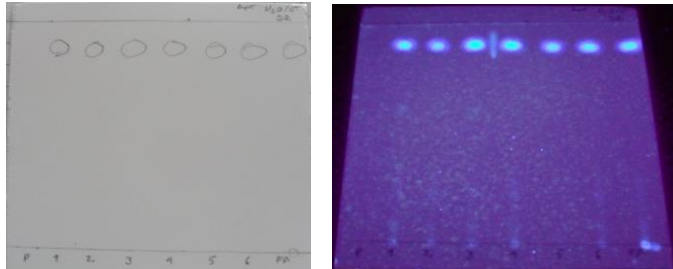
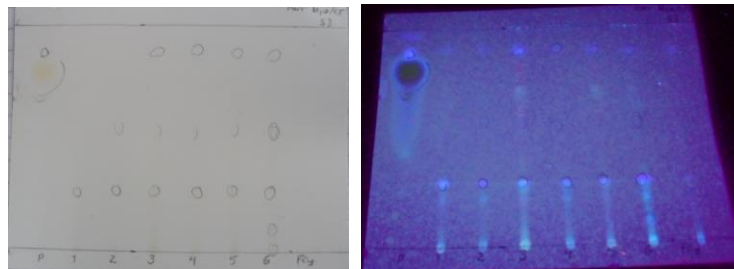
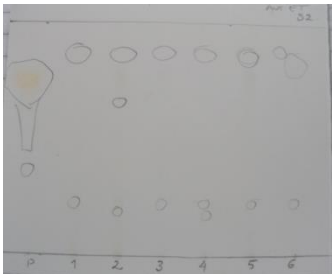
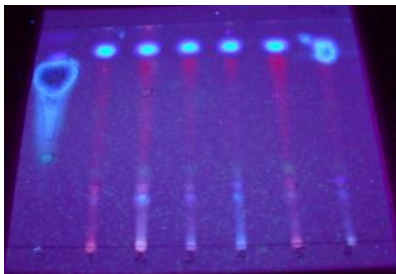
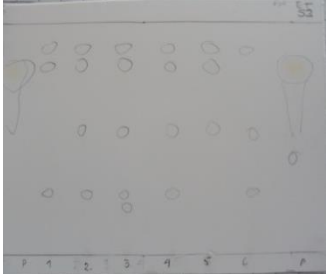
Luz	Patrón	Fracción A							Fracción B					
Extractos Acuosos	Antrona	EA-S-LI-F	EA-S-LI-G	EA-C-Se-F	EA-C-Se-G	EA-S-Se-F	EA-S-Se-G	Antrona	EA-S-LI-F	EA-S-LI-G	EA-C-Se-F	EA-C-Se-G	EA-S-Se-F	EA-S-Se-G
Visible	0,4 0,7	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela	0,4 0,7	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela
365 nm	0,4 0,7 0,8	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,4 0,7 0,8	0,08 --- --- 0,94	0,08 0,28 0,52 0,92	0,08 0,26 ---- 0,94	0,08 0,26 0,52 0,88	0,08 0,26 --- 0,88	0,08 0,26 0,48 0,88
Fotografía de placa de CCD después de derivatizar														
	Visible							365 nm						
														
	Visible							365 nm						

Tabla 4-42. Resultados de CCD para compuestos antracénicos en muestras de extracto acuoso

Luz	Patrón	Fracción A						Fracción B						
Extractos Hidroalcohólicos	Antrona	EHA-S-LI-F	EHA-S-LI-G	EHA-C-Se-F	EHA-C-Se-G	EHA-S-Se-F	EHA-S-Se-G	EHA-S-LI-F	EHA-S-LI-G	EHA-C-Se-F	EHA-C-Se-G	EHA-S-Se-F	EHA-S-Se-G	EHA-S-LI-F
Visible	0,80	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,80	NR	NR	NR	NR	NR	NR
365 nm	0,40							0,80	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26
	0,70	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	---	---	---	0,52	---	0,52	0,52
	0,80							0,90	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88
Fotografía de placa de CCD despues de derivatizar														
	Visible							Visible						
		354 nm								365 nm				

NR: No revela

Tabla 4-43. Resultados de CCD para compuestos antracénicos en muestras de extracto hidroalcohólico

Luz	Patrón	Fracción A							Fracción B									
Extractos Etanólicos	Antrona	EE-S-LI-F	EE-S-LI-G	EE-C-Se-F	EE-C-Se-G	EE-S-Se-F	EE-S-Se-G	EE-S-LI-F	EE-S-LI-G	EE-C-Se-F	EE-C-Se-G	EE-S-Se-F	EE-S-Se-G	EE-S-LI-F				
Visible	0,80	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR				
365 nm	0,16	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	0,24	---	---	0,20	0,20	---	---	0,20				
	0,80	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26	0,26				
									---	0,52	0,52	0,52	---	0,52				
									0,8 ¹	0,8 ¹	0,8 ¹	0,80 ¹	0,80 ¹	0,80 ¹				
									0,88	0,88	0,88	0,88	0,88	0,88				
Fotografía de placa de CCD despues de derivatizar																		
	Visible						365 nm						Visible					
													365 nm					

NR: No revela
Tabla 4-44. Resultados de CCD para compuestos antracénicos en muestras de extracto etanólico

4.16.4 Compuestos terpénicos / esteroidales

De acuerdo con caracterizaciones previas, se encontró la presencia significativa de triterpenos y compuestos esteroidales (Zocoler, 2006; Chen et al, 2009; Lin, 2011; Taylor, 2012). Según Rodrigues, solamente se confirmaron esteroides y ausencia de triterpenos, tanto por pruebas químicas de tubo como por CCD. Sin embargo aclara en su estudio que estos resultados son contradictorios con los múltiples reportes no solo de presencia sino de estructuras químicas claramente identificadas, lo cual lo atribuye a diferencias ambientales de la planta utilizada proveniente de São José Ribamar en Brasil, que varían el contenido de metabolitos secundarios (Rodrigues et al., 2010). Este grupo de metabolitos especialmente tiene gran importancia ya que se atribuye en parte la actividad hipoglicémica de la planta a la presencia de compuestos como los fitoesteroles de la mezcla charantina, Kuguacinas y momordicinas (Giner y Castillo, 2003). Los compuestos triterpénicos de *Momordica charantia* L. se caracterizan por el núcleo de triterpeno tipo cucurbitano del cual varían tanto las sustituciones como insaturaciones para aportar los más de 50 triterpenos que hasta ahora han sido identificados y aislados.

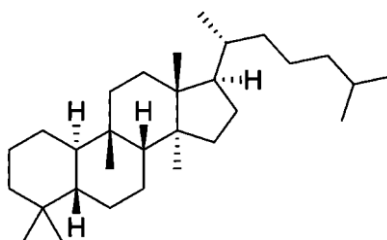


Figura 4-4. Estructura núcleo de triterpeno tipo cucurbitano

Se evaluaron las fases móviles clorofomo: metanol (95:10), acetato de etilo: metanol : agua (77:15:8) y éter de petróleo : acetato de etilo (8:2), encontrando que solo este último sistema permitía la separación y confirmación de estos compuestos tras la derivatización química con Reactivo de Lieberman Burchard.

Para todos los extractos se evidencia la presencia de compuestos terpénicos/esteroidales dada por las coloraciones luego de la aplicación del reactivo de Lieberman Burchard. Sin embargo, el extracto etanólico el que refleja el mayor contenido de compuestos así como de concentraciones evidenciado por la intensidad de las manchas (Tabla 4-47). Este comportamiento se esperaba dada la afinidad de estos metabolitos por solventes de menor polaridad que el agua, por lo que en orden creciente la placa de extractos acuosos es la que se observa con menor presencia de compuestos, seguida de la placa de extractos hidroalcohólicos

y por ultimo la placa de extractos etanólicos.

Aunque en general los triterpenos son compuestos incoloros y de difícil detección por su reactividad, las cucurbitacinas tienen la característica de poder ser detectados sin tratamiento químico bajo luz UV 254 nm y 365 nm (Waksmundzka, Sherma, Kowalska, 2008).

Dentro de los compuestos evidenciados en las placas se detectaron clorofilas, reconocidas por su coloración roja bajo la luz UV por lo cual es muy importante tener registro de la placa antes y después de revelar para evitar asumir falsos positivos de reacción en la detección química de los compuestos. Adicionalmente se visualiza la presencia de varios compuestos terpénicos/ esteroidales diferenciados por sus coloraciones azul, verde, rojo y café entre otras tal como esta reportado por ejemplo para las cucurbitacinas (Waksmundzka, Sherma, Kowalska, 2008).

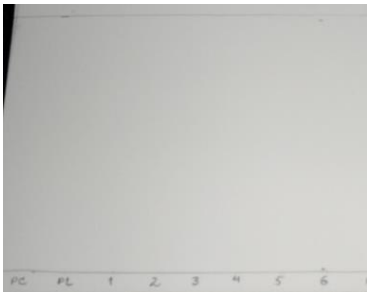
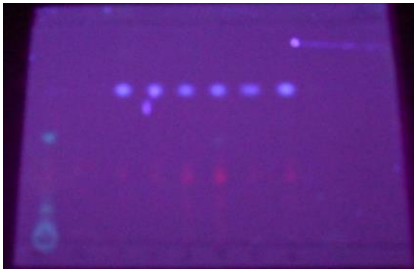
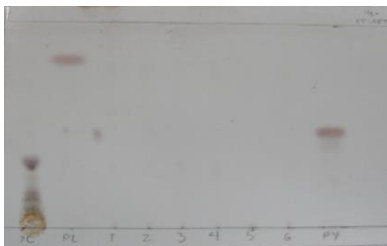


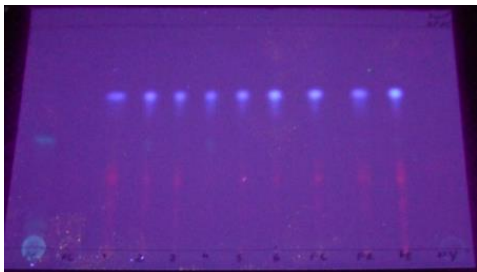
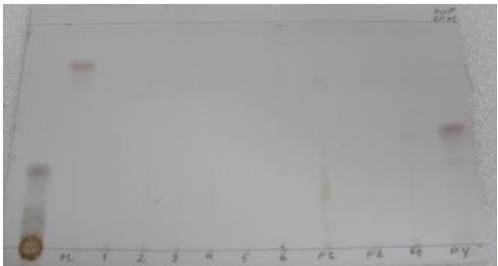
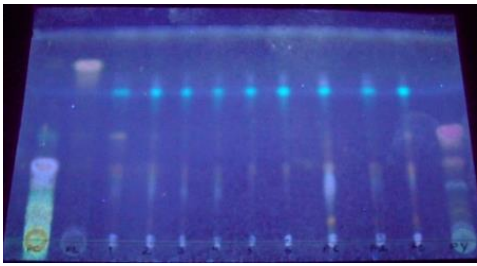
Extracto	Patrón			Muestra					
Acuoso	Colesterol	Lupeol	Triterpenos de Yatago	EA-S-LI-F	EA-S-LI-G	EA-C-Se-F	EA-C-Se-G	EA-S-Se-F	EA-S-Se-G
Visible – derivatizado con Lieberman Burchard	0,32 0,46	0,80	0,46	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela
365 nm	0,30 0,46	0,46 0,80	0,24 0,32 0,40 0,46	0,30	0,30 0,68 0,80	0,30 0,68 0,80	0,30 0,68 0,80	0,30 0,68 0,80	0,30 0,68 0,80
Placa CCD Antes de la derivatización con Lieberman Burchard									
	Visible			UV-365 nm					
Placa CCD después de la derivatización con Lieberman Burchard									
	Visible			UV-365 nm					

Tabla 4-45. Resultados de CCD de compuestos terpénicos/esteroidales en muestras de extractos acuosos

Extracto	Patrón			Muestra								
<i>Hidroalcohólico</i>	Colesterol	Lupeol	Triterpenos de Yatago	EHA-S-LI-F	EHA-S-LI-G	EHA-C-Se-F	EHA-C-Se-G	EHA-S-Se-F	EHA-S-Se-G	EHA-S-LI- Fr	EHA-C-Se- Fr	EHA-S-Se- Fr
<i>Visible – derivatizado con Lieberman Burchard</i>	0,32 0,46	0,80	0,48	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	0,26 0,68	NR
365 nm	0,30 0,46	0,46 0,80	0,24 0,32 0,40 0,46	0,24 0,30 0,32 0,46 0,68	0,30 0,68	0,30 0,68	0,24 0,30	0,30 0,68	0,30 0,68	0,32 0,68	0,10 0,26 0,32 0,46 0,68	0,10 0,28 0,32 0,46 0,68
<i>Placa CCD Antes de la derivatización con Lieberman Burchard</i>												
	Visible			UV-365 nm								
<i>Placa CCD después de la derivatización con Lieberman Burchard</i>												
	Visible			UV-365 nm								

NR: No revela

Tabla 4-46. Resultados de CCD de compuestos terpénicos/esteroidales en muestras de extractos hidroalcohólicos.

Extracto	Patrón			Muestra					
<i>etanólico</i>	Colesterol	Lupeol	Triterpenos de Yatago	EE-S-LI-F	EE-S-LI-G	EE-C-Se-F	EE-C-Se-G	EE-S-Se-F	EE-S-Se-G
<i>Visible derivatizado con Lieberman Burchard</i>	0,30	0,80	0,48	0,10 0,28 0,30 0,46 0,50 0,72 0,94	0,10 0,28 0,30 0,46 0,50 0,72 0,94	0,10 0,28 0,30 0,46 0,50 0,72 0,94	0,10 0,28 0,30 0,46 0,50 0,72 0,94	0,10 0,28 0,30 0,46 0,50 0,72 0,94	0,10 0,28 0,30 0,46 0,50 0,72 0,94

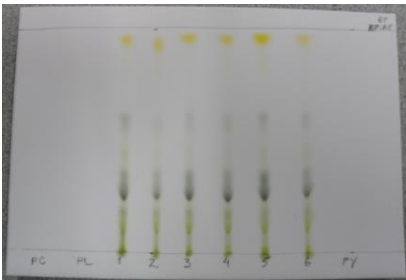
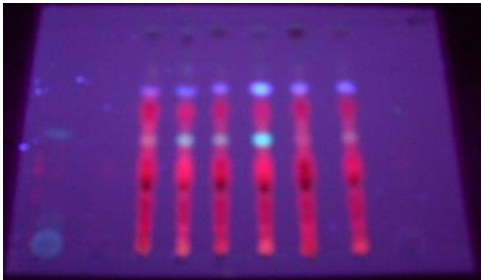
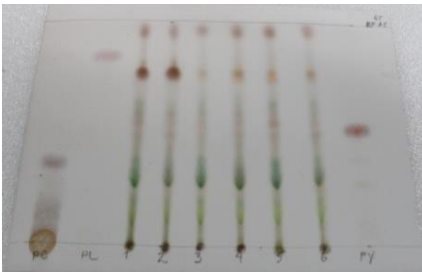
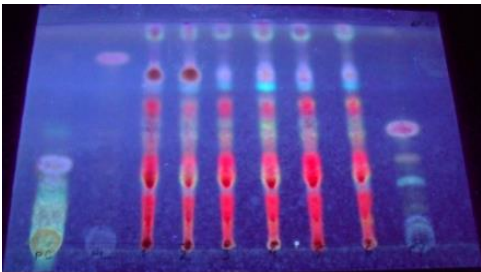
365 nm	0,30 0,48	0,80		0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	0,40	
				0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	0,46	
			0,10	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	
			0,14	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	0,52	
			0,24	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	0,56	
			0,34	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	0,66	
			0,46	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	0,68	
			0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72		
			0,94	0,94	0,94	0,94	0,94	0,94		
Placa CCD Antes de la derivatizacion con Lieberman Burchard									Visible	UV-365 nm
									Visible	UV-365 nm

Tabla 4-47. Resultados de CCD de compuestos terpénicos/esteroidales en muestras de extractos etanólicos

4.16.5 Glicósidos Cardiotónicos

Los compuestos cardiotónicos son comunes en hojas de las plantas de las familias Scrofulariaceae, Apocynaceae, Liliaceae, Ranunculaceae y Moraceae. Para las plantas de la familia cucurbitaceae no han sido reportados ni específicamente en *Momordica charantia* L.

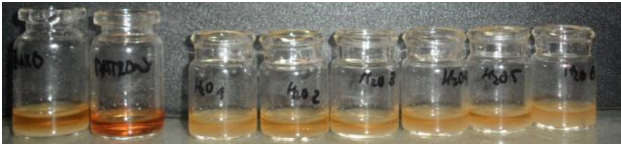
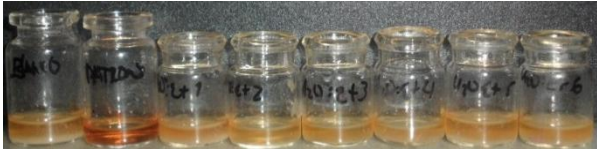
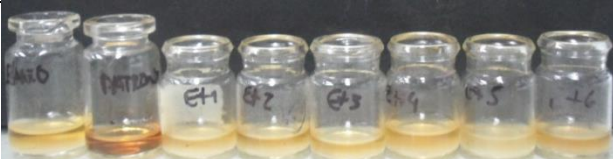
Muestra	Kedde	
	Resultado	Foto
Patron Extracto <i>Digitalis purpurea</i>	Positivo	
Blanco	Negativo	
EA-S-LI-F	Negativo	
EA-S-LI-G	Negativo	
EA-C-Se-F	Negativo	
EA-C-Se-G	Negativo	
EA-S-Se-F	Negativo	
EA-S-Se-G	Negativo	
EHA-S-LI-F	Negativo	
EHA-S-LI-G	Negativo	
EHA-C-Se-F	Negativo	
EHA-C-Se-G	Negativo	
EHA-S-Se-F	Negativo	
EHA-S-Se-G	Negativo	
EHA-S-LI-Fr	Negativo	
EHA-C-Se-Fr	Negativo	
EHA-S-Se-F	Negativo	
EE-S-LI-F	Negativo	
EE-S-LI-G	Negativo	
EE-C-Se-F	Negativo	
EE-C-Se-G	Negativo	
EE-S-Se-F	Negativo	
EE-S-Se-G	Negativo	

Tabla 4-48. Resultados de pruebas cualitativas de coloración de compuestos cardiotónico en extractos de *Momordica charantia* L.

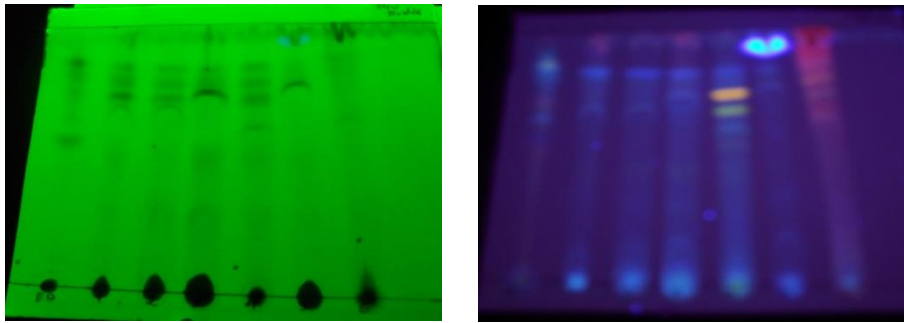
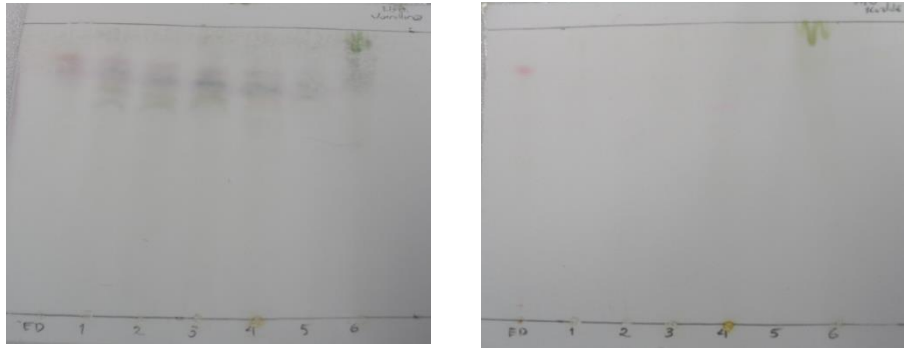
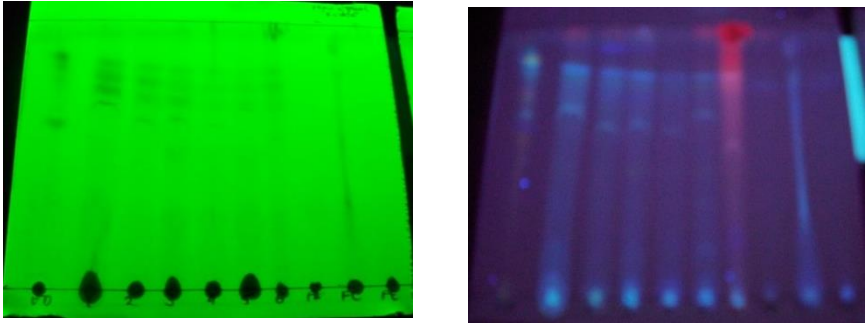
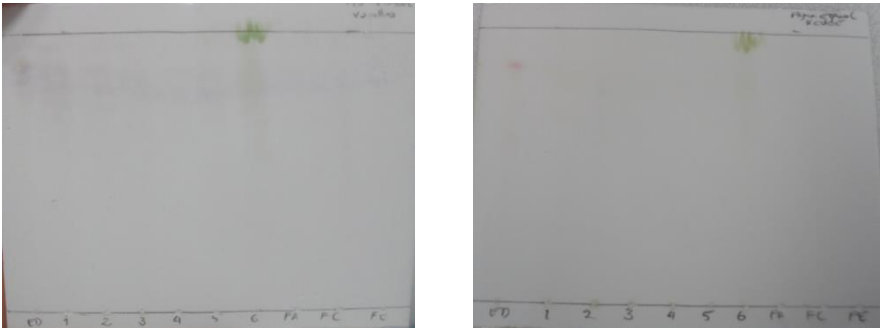
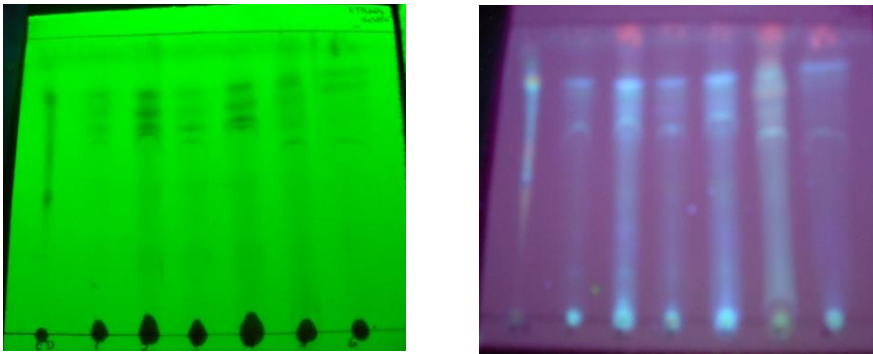
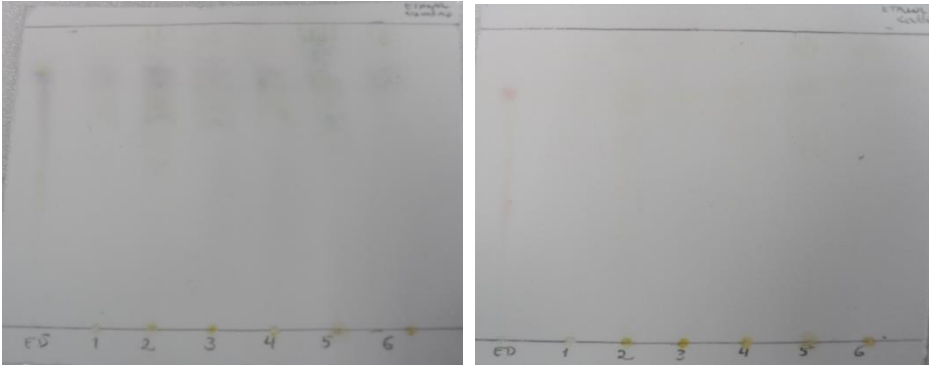
Extracto	Muestra						
Acuoso	Patron extracto <i>Digitalis purpurea</i>	EA-S-LI-F	EA-S-LI-G	EA-C-Se-F	EA-C-Se-G	EA-S-Se-F	EA-S-LI-F
Visible – Revelado Vainillina	0,80 0,88	0,88 0,80 0,70	0,88 0,80 0,70	0,88 0,80 0,70	0,88 0,80 0,70	0,80	0,80
Visible revelado con Kedde	0,84	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela	No revela
365 nm	0,84	0,74 0,80 0,86	0,74 0,80 0,86	0,74 0,80 0,86	0,74 0,80 0,86	0,74 0,80 0,86	0,74 0,80 0,86
Placa CCD antes derivatizar							
Placa CCD después de derivatizar							

Tabla 4-49. Resultados de CCD de compuestos cardiotónicos en muestras de extractos acuosos

Extracto	Muestra									
<i>Hidroalcohólico</i>	Patron extracto <i>Digitalis purpurea</i>	EHA-S-LI-F	EHA-S-LI-G	EHA-C-Se-F	EHA-C-Se-G	EHA-S-Se-F	EHA-S-Se-G	EHA-S-LI- Fr	EHA-C-Se- Fr	EHA-S-Se- Fr
<i>Visible – Revelado Vainillina</i>	0,88	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
<i>Visible revelado con Kedde</i>	0,84	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR	NR
<i>365 nm</i>	0,60 0,88	0,70 0,80	0,70 0,80	0,70 0,80	0,70 0,80	0,70 0,80	0,70 0,80	0,70 0,80	0,70 0,80	0,70 0,80
<i>Placa CCD antes de derivatizar</i>	 <div>254 nm</div> <div>365 nm</div>									
<i>Placa CCD después de derivatizar</i>	 <div>Vainillina 1% etanol-Acido fosfórico 10%</div> <div>Reactivo de Kedde</div>									

NR: No revela

Tabla 4-50. Resultados de CCD de compuestos cardiotónicos en muestras de extractos hidroalcohólicos

Extracto	Muestra						
Etanolico	Patron extracto <i>Digitalis purpurea</i>	EE-S-L-F	EE-S-L-G	EE-C-Se-F	EE-C-Se-G	EE-S-Se-F	EE-S-Se-G
Visible		0,60	0,60	0,60	0,60	0,60	0,60
Revelado	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80	0,80
Vainillina		----	0,92	0,92	0,92	0,92	0,92
Visible revelado con Kedde	0,42 0,84	NR	NR	NR	NR	NR	NR
365 nm	0,46 0,80	0,60	0,60 0,80 ----	0,60 0,80 0,92	0,60 0,80 0,92	0,60 0,80 0,92	0,60 0,80 0,92
Placa CCD antes de derivatizar	 <div>254 nm</div> <div>365 nm</div>						
Placa CCD después de derivatizar	 <div>Vainillina 1% etanol-Ácido fosfórico 10%</div> <div>Reactivo de Kedde</div>						

NR: No revela

Tabla 4-51. Resultados de CCD de compuestos cardiotónicos en muestras de extractos etanólicos

De acuerdo a los resultados de las pruebas de coloración y CCD se confirma la ausencia de glicósidos cardiotónicos tal como se había encontrado en estudios de caracterización del material vegetal (Andrade, 2012; Zocoler, 2006). Para el caso del patrón, extracto de *digitalis purpurea* donde se esperaba manchas intensas, se observan manchas coloreadas muy débiles en las placas después de revelar con los dos reactivos (Tablas 4-49, 4-50 y 4-51).

Lo anterior demuestra que el tratamiento de los extractos de material vegetal para aplicación en la placa, implican multiples pasos en los cuales se reduce el contenido de metabolitos y con lo cual se podría tener resultados negativos cuando la cantidad de metabolitos en la muestra sea muy baja.

4.17 CUANTIFICACIÓN DE FENOLES TOTALES

Como parte de la caracterización del material vegetal, se había planteado realizar al menos una determinación cuantitativa que permitiera hacer comparación de las muestras por lo cual se propuso la cuantificación de flavonoides o la cuantificación de fenoles. Sin embargo, el resultado de las pruebas de detección de flavonoides por cromatografía en capa delgada, evidenciaron que el contenido de estos metabolitos era muy bajo y que observaba una mayor presencia de compuestos fenólicos totales que incluyen flavonoides, ácidos fenólicos entre otros. Por lo anterior se consideró pertinente hacer la cuantificación de estos últimos mediante reacción de oxidación con reactivo Folin-Ciocalteu.

N°	Muestra	Peso de extracto (mg)	Absorbancia Promedio	Concentración mg AG/g extracto	Desviación estándar	IC 95% α 0,05
1	EA-S-LI-F	1,2	0,063	9,861	0,2778	9,86 \pm 0,690
2	EA-S-LI-G	1,0	0,050	7,500	0,5774	7,50 \pm 1,434
3	EA-C-Se-F	1,2	0,048	5,602	0,1604	5,60 \pm 0,398
4	EA-C-Se-G	1,5	0,057	6,481	0,1283	6,48 \pm 0,319
5	EA-S-Se-F	1,2	0,049	6,065	0,1604	6,06 \pm 0,398
6	EA-S-Se-G	1,5	0,051	5,296	0,4626	5,29 \pm 1,149
7	EHA-S-LI-F	1,0	0,063	11,944	0,5092	11,94 \pm 1,265
8	EHA-S-LI-G	1,3	0,047	5,085	0,3917	5,08 \pm 0,973
9	EHA-C-Se-F	1,2	0,050	6,250	0,0000	6,25 \pm 0,000
10	EHA-C-Se-G	1,5	0,055	6,037	0,1283	6,04 \pm 0,319
11	EHA-S-Se-F	1,0	0,060	10,722	0,5092	10,72 \pm 1,265
12	EHA-S-Se-G	1,5	0,056	6,259	0,3395	6,26 \pm 0,843
13	EHA-S-LI- Fr	1,1	0,049	6,515	0,3030	6,52 \pm 0,753
14	EHA-C-Se- Fr	1,2	0,051	6,620	0,4243	6,62 \pm 1,054
15	EHA-S-Se- Fr	1,1	0,049	6,414	0,1750	6,41 \pm 0,435
16	EE-S-LI-F	1,3	0,123	24,487	4,1265	24,49 \pm 10,251
17	EE-S-LI-G	1,4	0,104	18,294	1,5121	18,29 \pm 3,756
18	EE-C-Se-F	1,2	0,127	27,639	1,2729	27,64 \pm 3,162
19	EE-C-Se-G	1,6	0,131	21,563	2,7083	21,56 \pm 6,728
20	EE-S-Se-F	1,1	0,100	21,869	1,2616	21,87 \pm 3,134
21	EE-S-Se-G	1,4	0,083	13,214	0,2381	13,21 \pm 0,591

$t_{\alpha 0,05} (2 \text{ GL}) = 4,3027$

Tabla 4-52. Resultados de cuantificación fenoles totales reportados como μg Acido Gálico/g de extracto

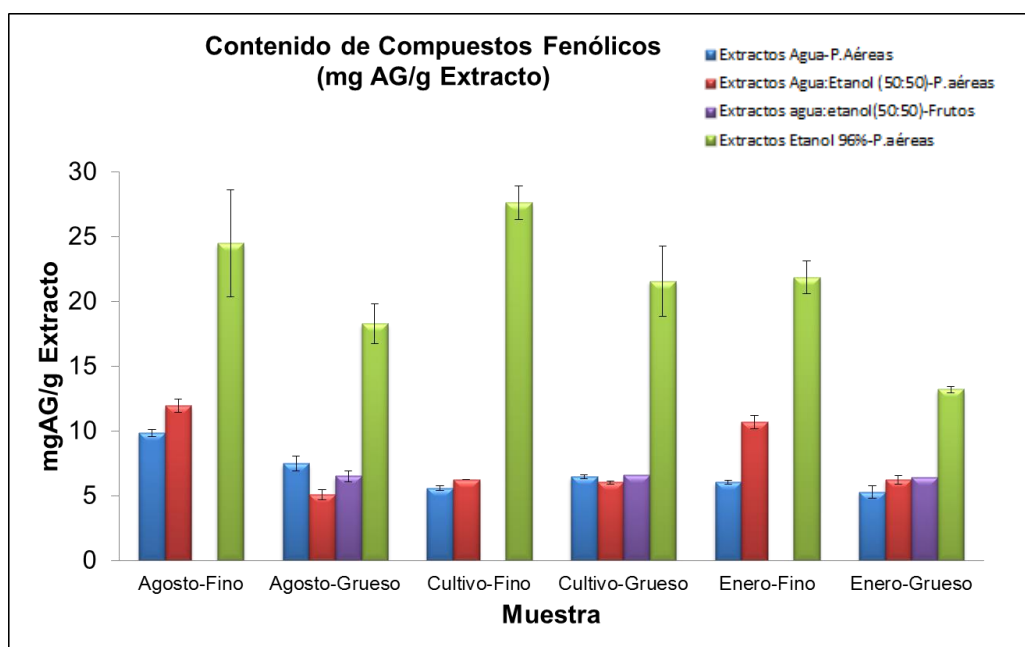


Grafico 4-12. Contenido de fenoles totales (reportados como mg AG/g extracto) en muestras de extractos de *Momordica charantia* L.

Al obtener los resultados de la cuantificación de fenoles totales (reportados como *mg ácido gálico/ g de extracto*) en los diferentes extractos de las muestras de *Momordica charantia* L., se evidencia que en general las concentraciones son bajas acorde a la curva de calibración preparada y en comparación con los valores obtenidos en otros estudios.

Para el caso de extractos acuosos, los resultados obtenidos para las muestras de *Momordica charantia* L. son inferiores a 10 mg AG/g extracto siendo inferiores a los valores reportados para plantas de diferentes familias e inclusive de la familia Cucurbitaceae como se muestra en la tabla 4-53 (Tawaha, 2007):

Material vegetal	Familia	Contenido de compuestos fenólicos Extracto acuoso (mg AG/g extracto seco)
Caléndula <i>Calendula officinalis</i>	Asteraceae	17,0
Manzanilla (<i>Matricaria recutita</i> L.)	Asteraceae	20,6
<i>Bryonia cretica</i> L	Cucurbitaceae	22,4
<i>Scolymus maculatus</i>	Asteraceae	16,6
<i>Ginkgo biloba</i> L.	Gonkgoaceae	39,0
<i>Hypericum triquetrfolium</i> Turra	Hypericaceae	44,6

Tabla 4-53 Valores reportados de contenido de compuestos fenólicos en extractos acuosos para plantas de diferentes familias.

Respecto a los extractos etanólicos, también se observa que para todas las muestras los valores son muy inferiores a los valores reportados para otras plantas, como se refleja en la tabla 4-54 (Pereira, 2009):

Material vegetal	Familia	Contenido de compuestos fenólicos Extracto etanólico mg AG/g extracto seco
Tomillo limón <i>Thymus citriodorus</i>	Lamiaceae	138,75±13,56
Retama blanca <i>Cytisus multiflorus</i>	Fabaceae	140,39±11,67
<i>Lathyrus binatus</i>	Fabaceae	180,88±5,61
<i>Onobrychis scardica</i>	Fabaceae	115,23±4,18
<i>Anthyllis áurea</i>	Fabaceae	108,96±3,14
<i>Trifolium pannocicum</i> L.	Fabaceae	106,81±2,38
<i>Oxytropis campestris</i> L.	Fabaceae	79,52±5,29
<i>Anthyllis vulneraria</i> L.	Fabaceae	79,34±2,86
<i>Oxytropis halleri</i>	Fabaceae	78,84±3,19
<i>Astragalus glycyphyllos</i> L.	Fabaceae	44,6±2,13
<i>Coronilla enerus</i> L.	Fabaceae	38±1,06

Tabla 4-54. Valores reportados de contenido de compuestos fenólicos en extractos etanólicos para algunas plantas

En general al comparar visualmente los resultados en la Gráfica 4-12, las muestras de recolección silvestre como las de cultivo exhiben un comportamiento similar, obteniendo valores cercanos o iguales a 10 mgAC/G extracto para los extractos acuosos e hidroalcohólicos. Para el caso de los extractos alcohólicos, los valores cercanos o superiores a 20 mg AG/g extracto. De igual manera se percibe para todas las muestras que la cuantificación se favorece cuando se analizan extractos obtenidos con material vegetal de tamaño fino.

El análisis de varianza ANOVA para confirmar estadísticamente si existía diferencia en el contenido de fenoles totales y las variables a las cuales podría asociarse esta variación, se confirma que existe una influencia significativa del solvente, la fuente de la muestra y del tamaño de partícula, en la concentración de fenoles totales del extracto.

Al evaluar el impacto de la fuente de la muestra y el solvente para cada uno de los tamaños se evidencia una variación del contenido de fenoles atribuido a ambas variables; el mismo comportamiento se observa para los extractos realizados con material vegetal de tamaño

fino y grueso como se observa en las Tablas 4-55 y 4-56.

Muestras de extractos de tamaño fino

H_0 : No hay diferencia significativa en la media del contenido de fenoles totales entre los extractos realizados con diferentes muestras de material vegetal de tamaño de partícula fino en diferentes solventes (Agua: Agua Etanol 50:50/ Etanol 96%)

Constante	Variables	F calculado	F critico	Resultado	
Tamaño fino	Muestra	7,56	3,55	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0
	Solvente	347,53	3,55	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0

Tabla 4-55. Resultados ANOVA para contenido de fenoles totales en muestras de extracto obtenido con material vegetal de tamaño fino

Es importante aclarar que la diferencia de medias observada en la Tabla 4-55 en los datos de tamaño fino, se debe a diferencia entre los tres solventes.

La variabilidad asociada a la muestra cuando el material es más fino se atribuye a la diferencia entre las tres muestras, después de hacer test pareados y aplicar una prueba de diferencia de medias.

Muestras de extractos de tamaño grueso

H_0 : No hay diferencia significativa en la media del contenido de fenoles totales entre los extractos realizados con diferentes muestras de material vegetal de tamaño de partícula grueso en diferentes solventes (Agua: Agua Etanol 50:50/ Etanol 96%)

Constante	Variables	F calculado	F critico	Resultado	
Tamaño grueso	Muestra	19,13	3,55	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0
	Solvente	344,71	3,55	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0

Tabla 4-56. Resultados ANOVA para contenido de fenoles totales en muestras de extracto obtenido con material vegetal de tamaño grueso

La variabilidad entre los datos tamaño grueso reflejada en la Tabla 4-56, la aporta principalmente los resultados de contenido de fenoles en extractos etanólicos.

La variabilidad atribuida a la muestra, se presenta por la diferencia de medias entre las muestras de recolección silvestre de diferentes épocas del año, indicando que la muestra de época lluviosa exhibe un mayor contenido de fenoles totales.

Al realizar la evaluación de variabilidad manteniendo el solvente constante, se encuentra que existe una diferencia significativa en el contenido de fenoles totales en los extractos de los tres solventes que se pueden asociar tanto al efecto de la polaridad como del tamaño de partícula del material vegetal como se observa en la Tabla 4-57. Los tamaños más finos son los que permiten

extractos más ricos en compuestos fenólicos lo que puede atribuirse a la mayor penetración del solvente cuando el material es más fraccionado. A su vez el solvente que logra mejores resultados es el etanol lo cual se asocia a la menor polaridad del alcohol que favorece la extracción polifenoles.

H_0 : No hay diferencia significativa en la media de contenido de fenoles totales entre extractos realizados con diferentes muestras de material vegetal y distinto tamaño en cada uno de los solventes analizados

Constante	Variables	F calculado	F crítico	Resultado	
Agua	Muestra	139,47	3,88	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0
	Tamaño	21,93	4,75	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0
Agua : etanol (50:50)	Muestra	83,13	3,88	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0
	Tamaño	496,71	4,75	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0
Etanol	Muestra	15,03	3,88	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0
	Tamaño	43,90	4,75	$F_{crit} < F_{cal}$	Se rechaza H_0

Tabla 4-57. Resultados ANOVA para contenido de fenoles totales en muestras de extractos de cada solvente obtenido con material vegetal

Muestras de extractos de frutos

Para el caso de los frutos se observa un comportamiento similar de las tres muestras y a su vez no se evidencia diferencia respecto a los extractos de otras partes aéreas (Tabla 4-58).

H_0 : No hay diferencia significativa en la media del contenido de fenoles totales entre las muestras de frutos

Constante	F calculado	F critico	Resultado	
Frutos	0,31	5,14	$F_{crit} > F_{cal}$	Se acepta H_0

Tabla 4-58. Resultados ANOVA para contenido de fenoles totales en muestras de extractos hidroalcohólicos de frutos

4.18 Comparacion entre los resultados de muestras silvestres y de cultivo

Análisis		Muestras silvestres		Muestra cultivo
		S-LI	S-Se	C-Se
Descripción física Material fresco		Planta herbácea trepadora con zarcillos.	Planta herbácea trepadora con zarcillos.	Planta herbácea trepadora con zarcillos.
Descripción física de material seco		Material principalmente compuesto por tallos gruesos, secos pero rígidos y no se fragmentan fácilmente. Los zarcillos que se desprenden de los mismos son delgados y frágiles. Las hojas son color verde oscuro, rugosas y friables.	El material está compuesto por tallos delgados y mayor proporción de hojas. Las hojas son de color verde oscuro, rugosas y friables.	El material está compuesto por tallos y hojas. Se observan algunos tallos delgados y gran proporción de hojas verdes, rugosas y friables.
Descripción física de material seco molido		Predominantemente verde con mezcla de partículas amarillas Fibroso principalmente	Predominantemente verde. Polvo con algunas fibras	Predominantemente amarillo con algunas partículas verdes Mezcla fibroso/ partículas friables
Distribución de tamaños	1,0 mm	5,63	1,68	4,55
	0,59 mm	15,00	6,35	11,27
	0,38 mm	22,65	16,51	16,00
	0,25 mm	14,10	11,42	13,24
	0,15 mm	23,70	32,31	14,54
	Colector	18,92	31,73	40,41
Humedad (%)		11,33 ± 3,480	10,52 ± 0,516	9,34 ± 0,444
Material extraíble agua (mg extracto/g MV)		147,45-223,22	159,59-273,73	81,46-201,90
Material extraíble en agua:etanol (mg extracto/g MV)		163,18-206,54	176,32-283,68	93,59-209,56
Material extraíble en etanol (mg extracto/g MV)		23,89-118,60	24,38-173,74	24,58-122,52
Material extraíble frutos en agua:etanol (mg extracto/g MV)		149,925	140,992	155,851
Cenizas totales (%)		9,92± 0,324	11,96± 0,438	9,34± 0,447
Cenizas insolubles en ácido (%)		0,50±0,169	0,35±0,230	0,91±0,318
Índice de espuma		200	250	250
Alcaloides		Ausente	Ausente	Ausente
Flavonoides/ compuestos fenólicos		Presente	Presente	Presente
Compuestos antracénicos		Ausente	Ausente	Ausente

Análisis	Muestras silvestres		Muestra cultivo C-Se
	S-Li	S-Se	
Compuestos Terpénicos Esteroidales	Presente	Presente	Presente
Compuestos cardiotónicos	Ausente	Ausente	Ausente
Saponinas	Presente	Presente	Presente
Compuestos Fenólicos en partes aéreas (mg AG/g Extracto) Extracto acuoso	6,83-10,14	5,44-6,25	5,418-6,56
Compuestos Fenólicos en partes aéreas (mg AG/g Extracto) Extracto hidroalcohólico	4,74 -12,50	5,89-11,17	5,89-6,25
Compuestos Fenólicos en partes aéreas (mg AG/g Extracto) Extracto Etanólico	16,55-29,10	12,98-22,88	19,90-28,75
Compuestos Fenólicos en frutos (mg AG/g Extracto)	6,52 ± 0,753	6,41 ± 0,435	6,62 ± 1,054
RTV (ufc/g)	215	240	280
Hongos y levaduras	37	71	111
Enterobacterias	92	66	23
<i>E.Coli</i>	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Salmonella</i>	Ausente	Ausente	Presente
<i>Pseudomona spp</i>	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Bacillus cereus</i>	Presente	Presente	Presente
<i>Clostridium</i>	Ausente	Ausente	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente	Ausente	Ausente

Tabla 4-59. Resumen comparativo de resultados de análisis fisicoquímicos y de caracterización de muestras de recolección silvestre y muestra de cultivo

Se observa en general en la tabla 4-59 que resume los resultados de análisis tanto fisicoquímicos como fitoquímicos que no hay una diferencia considerable entre los valores obtenidos en los ensayos de las muestras de recolección silvestre y la muestra de cultivo.

En aspecto físico del material vegetal de las muestras refleja características similares tanto de la planta entera fresca, seca y molida; se evidencia una diferencia en el color que se atribuye a la predominancia de órganos, siendo más verde cuando hay abundancia de hojas, y amarillo cuando priman los tallos.

Las muestras dieron como resultado, contenidos de cenizas y recuentos de microorganismos

similares, lo cual se atribuye a la adecuada manipulación en las actividades pos-cosecha. Cabe resaltar que en la muestra de cultivo se observaron algunos microorganismos patógenos atribuibles posiblemente al agua de riego por la presencia de animales en el terreno donde fue sembrada la planta, ya que estos no se confirmaron en las muestras de recolección silvestre. De igual manera se resalta que la presencia de estos microorganismos patógenos es una alerta para implementar mejoramiento en las prácticas de cultivo y recolección, ya que este tipo de contaminación dificulta el uso del material en productos fitoterapéuticos.

En cuanto a los análisis de detección cualitativa de metabolitos secundarios se demostró una presencia importante de compuestos terpénicos /esteroidales y saponinas tanto en muestras de recolección silvestre como de cultivo. Los flavonoides y compuestos fenólicos se encuentran en baja cantidad pero en forma similar para todas las muestras independiente de la fuente de obtención y la época de recolección.

Finalmente, al determinar el contenido de compuestos fenólicos en extractos acuosos, hidroalcohólicos y etanólicos de las muestras de distinta fuente y época de recolección, se confirma que existe diferencia significativa en las cuantificaciones. Es importante mencionar que a pesar de existir influencia demostrada estadísticamente de la fuente de la muestra, solvente de extracción y tamaño de partícula del material vegetal usado sobre el contenido de compuestos fenólicos, los extractos etanólicos son los que arrojaron mayores valores para todas las muestras.

A su vez, en los extractos etanólicos, puede evidenciarse que los extractos que utilizan material más fino reflejan mayores contenidos de compuestos fenólicos para todas las muestras que los que utilizan material más grueso. Posiblemente puede deberse a que los compuestos fenólicos se encuentran en la planta de forma preferente en hojas más que en tallos y adicionalmente, a la mayor superficie de contacto entre el material y el solvente que facilita la humectación, penetración en las células y disolución de metabolitos.

Es importante resaltar que a pesar de que existen numerosos estudios científicos donde se ha demostrado la actividad y utilidad de las partes aéreas de toda la planta, a nivel mundial es limitado y reconocido el uso del fruto (WHO, 2009). La información de calidad obtenida contribuye a la consideración de las partes aéreas dentro de la droga de *Momordica charantia* L, para la elaboración de productos fitoterapéuticos, aunque debe ser complementado con estudios de actividad farmacológica.

En Colombia donde la droga aprobada contempla todos los órganos según el Vademecun colombiano de plantas medicinales (Ministerio de Protección Social, 2008), la aplicabilidad como una guía en el control de calidad es mas tangible y representa una utilidad mas inmediata. No obstante es de considerar la inclusión tanto de los de los frutos verdes y semillas , ya que estos órganos están reportados dentro del listado de plantas tóxicas del INVIMA de la sala especializada de productos naturales, actualizado en octubre de 2013 (establecido en el acta 09 de 2012 numeral 3.3) por su potencial tóxico, atribuido a algunos triterpenoides cucurbitanos (momordicosidos y momordicinas) y lectinas (momodina). Se reporta la dosis letal del jugo LD50: 9 mg/kg y del extracto alcoholico 36 mg/kg.

4.19 Influencia de parámetros de calidad de material vegetal sobre extractos

La caracterización de las muestras de diferentes fuentes evidenció que para la mayoría de parámetros la variación no es significativa. Los extractos se utilizaron para evaluar la presencia e inferir el contenido de metabolitos secundarios encontrando que en el análisis cualitativo de cromatografía en capa delgada la presencia o ausencia de metabolitos tiene el mismo comportamiento para todas las muestras que se extrayeron con el mismo solvente o mezcla solvente. Lo anterior permite inferir el adecuado manejo del material vegetal previo a los procesos de extracción dado por los los resultados de contenidos de cenizas Adicionalmente se puede mencionar que el contenido de humedad residual de la droga fue el adecuado para reducir procesos degradativos que pudieran afectar el contenido de metabolitos en el extracto.

El tamaño de partícula del material vegetal de cada muestra fué dividido en grueso ($>380\ \mu\text{m}$) y fino ($<380\ \mu\text{m}$) para establecer el impacto sobre los extractos, encontrando que en algunos casos se favorece el tamaño mas pequeño para un mejor rendimiento y mayor extracción de metabolitos secundarios, pero este no debe ser demasiado fino y cohesivo como para dificultar humectación de partículas y la penetración de solvente. También puede explicarse que haya un mejor comportamiento de los extractos con tamaño fino atribuyendo a que hay mayor concentración de metabolitos en las hojas, las cuales al molerse siendo tan friables son las que componen la porción de menor tamaño.

4.20 Propuesta de Monografía de calidad para *Momordica charantia* L.

Con base en los resultados obtenidos en la tabla 4-59 y la revisión bibliográfica realizada como fundamento teórico de este estudio, se propuso una monografía de referencia para el control de calidad del material vegetal de *Momordica charantia* L (Anexo 7-6). Según la información incluida, es una monografía mixta de control de calidad, seguridad y eficacia de acuerdo con la Tabla 2-5, que se aproximaría a las emitidas por OMS. Sin embargo debe tenerse en cuenta que esta guía solo es una propuesta realizada con base en el análisis de tres muestras de material vegetal obtenidos de la misma región, que debería ser retada y alimentada con información de otras muestras que puedan capturar mas información de la variabilidad del material o confirmar lo obtenido en este estudio.

Para la elaboración de este anexo, se tomó la información mas relevante de la revisión bibliográfica y los resultados característicos de esta planta para los diferentes ensayos fisicoquímicos, fitoquímicos y microbiológicos. Para el caso de los resultados cuantitativos, los rangos de variación son resultado de límites mínimo y máximo de los valores obtenidos experimentalmente y los límites de confianza calculados con base en la dispersión de datos.

5. CONCLUSIONES

- 5.1 No se evidenció diferencia significativa en la mayoría de resultados de los análisis realizados a las muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L. tanto de recolección silvestre como de cultivo.
- 5.2 La época de colecta no modificó las propiedades farmacognósticas ni fitoquímicas evaluadas en las muestras de *Momordica charantia* L. de recolección silvestre.
- 5.3 El tamaño de partícula de las partes aéreas de *Momordica charantia* L. afectó el contenido de material extraíble y el de fenoles totales, posiblemente asociado al mayor contenido de hojas en el material más fino.
- 5.4 Se evidenció la contaminación del material vegetal proveniente de cultivo con *Salmonella* spp. y la presencia de *Bacillus cereus* en todas las muestras.
- 5.5 Los extractos se comportaron de forma similar en los análisis cualitativos de detección de los metabolitos secundarios evaluados, evidenciando que no existió influencia de los resultados de análisis fisicoquímicos en los rangos obtenidos, sobre el contenido de metabolitos secundarios.
- 5.6 Se evaluó el fruto de forma independiente, mostrando un comportamiento similar para todas las muestras en rendimiento, los metabolitos secundarios detectados por CCD y contenido de fenoles totales. Frente a las demás partes aéreas si presentó diferencia significativa en el material extraíble.

5.7 Se determinó la influencia del solvente utilizado en extracción en el contenido de metabolitos secundarios, encontrando que a pesar de que los extractos etanólicos presentan menores rendimientos, exhiben de forma más clara la presencia de compuestos triterpénicos, flavonoides y otros compuestos fenólicos, y mayor contenido de fenoles totales.

5.8 Se elaboró una propuesta de monografía para las partes aéreas de *Momordica charantia* L.

6. RECOMENDACIONES

- 6.1 Desafiar los criterios de aceptación/ rechazo de la propuesta de monografía con otras muestras de material vegetal.
- 6.2 Profundizar en el establecimiento de otros marcadores terapéuticos o analíticos.
- 6.3 Realizar un estudio orientado a la estandarización y la optimización del proceso de extracción donde se pueda establecer las mejores condiciones del proceso apoyada en ensayos fitoquímicos cuantitativos, evaluación farmacológica y/o toxicológica.
- 6.4 Realizar análisis confirmatorios de la presencia de microorganismos patógenos en CEUNP y establecer el impacto de los hallazgos del mismo, en bioseguridad y sobre los materiales vegetales cultivados dentro de la estación experimental.

7. ANEXOS

Anexo 7-1. Estructuras químicas de compuestos reportados de *Momordica charantia* L.

Anexo 7-2 Datos resumidos de condiciones ambientales en Cali 2013-2014

Anexo 7-3. Dimensiones de los frutos de *Momordica charantia* L.

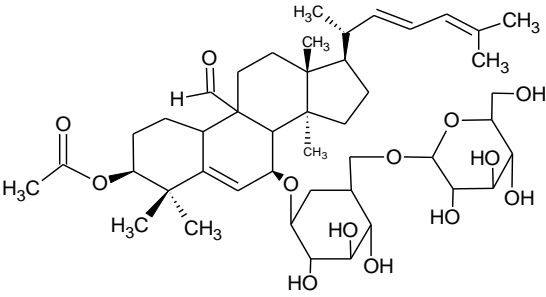
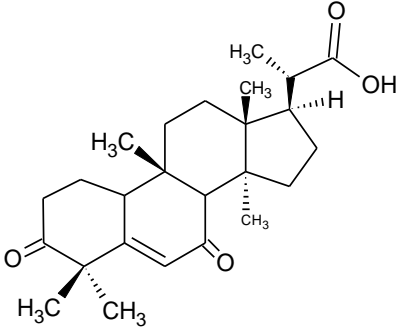
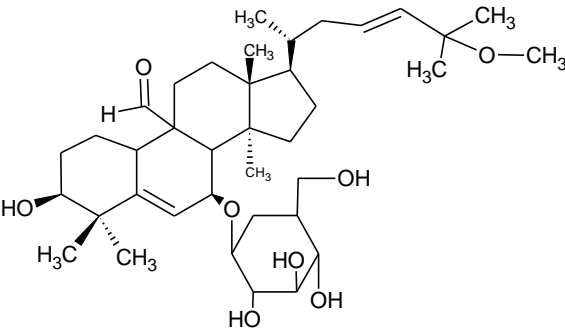
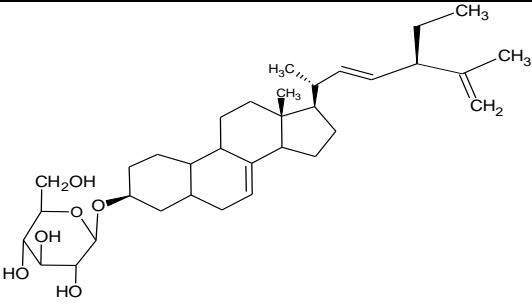
Anexo 7-4. Especificaciones de referencia para recuentos y presencia de microorganismos patógenos en muestras de material vegetal

Anexo 7-5. Resultados de recuentos y presencia de microorganismos patógenos en muestras de material vegetal de *Momordica charantia* L.

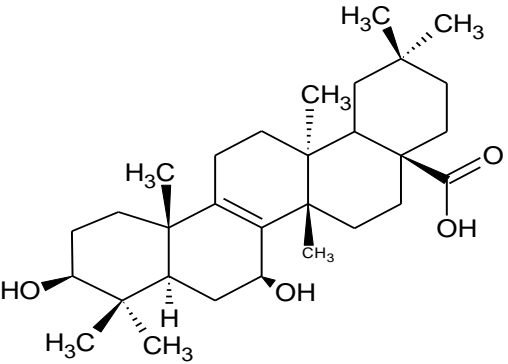
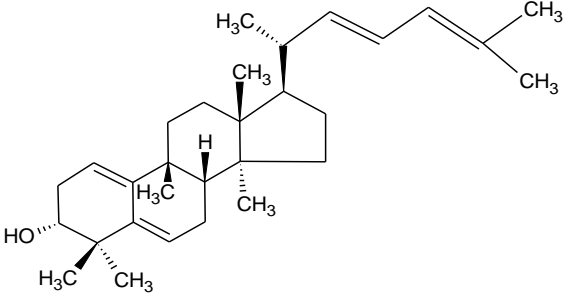
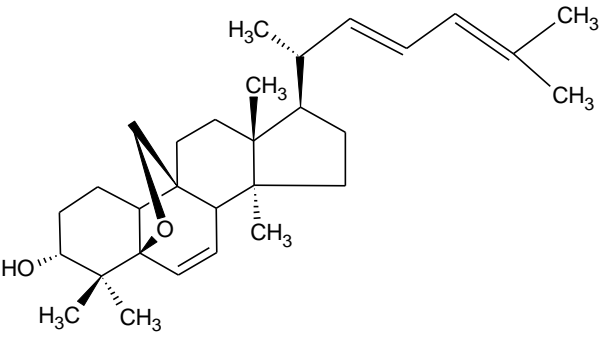
Anexo 7-6 Propuesta de monografía de partes aéreas *Momord* es que traje el carro a ver si lo podía guardar en tu parqueadero es que para volver aca no me lo dejan sacar *ica charantia* L.

ANEXO 7-1. COMPUESTOS QUIMICOS REPORTADOS EN *Momordica charantia* L.

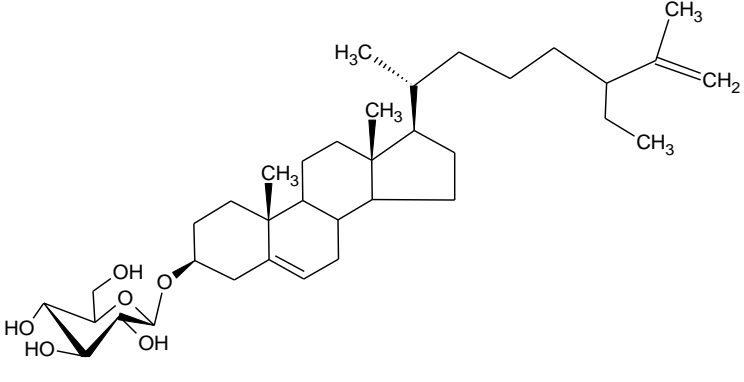
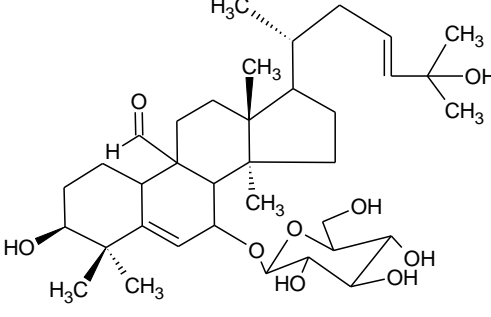
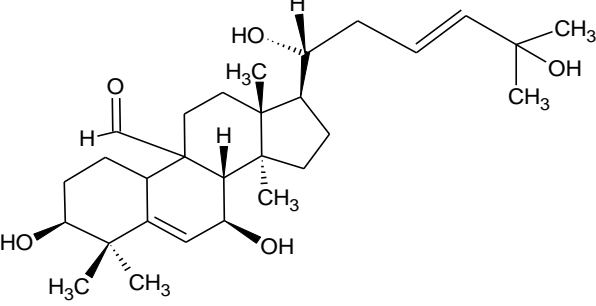
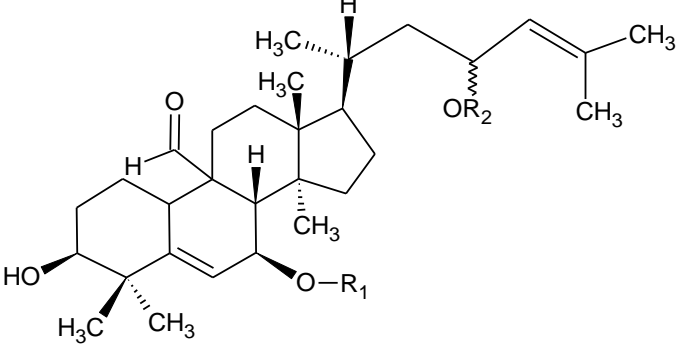
1. Hojas y frutos (Lin, 2011; Liu et al., 2010)

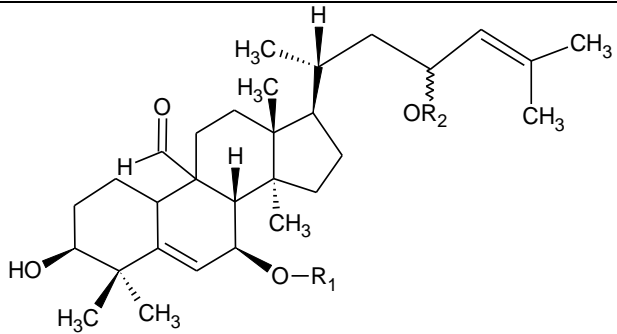
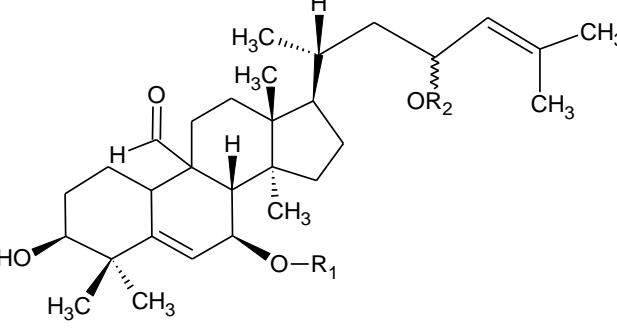
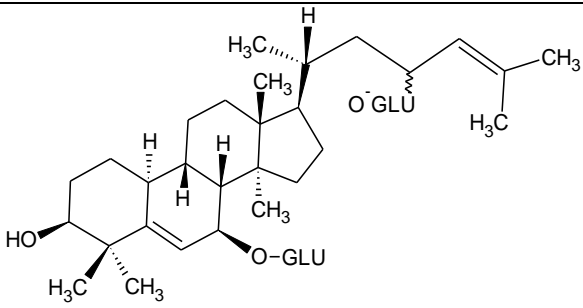
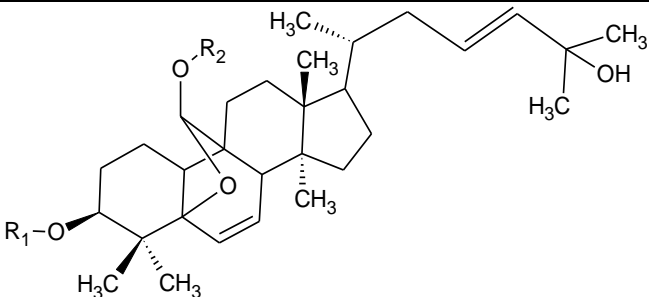
NOMBRE	TIPO	ESTRUCTURA
TAIWACINA A	GLICOSIDO CUCURBITANO TIPO TRITERPENO	
TAIWACINA B	23,24,25,26,27 PENTANOCUCURBITANO	
MOMORDICOSIDO K	GLICOSIDO CUCURBITANO TIPO TRITERPENO	
3-O-(β-D-glucopiranosil)-24β-etil-5α-chalesta-7,22,25(27)-trien-3β-ol	GLICOSIDO ESTEROIDAL	

2. Tallos (Lin, 2011; Liu et al., 2010)

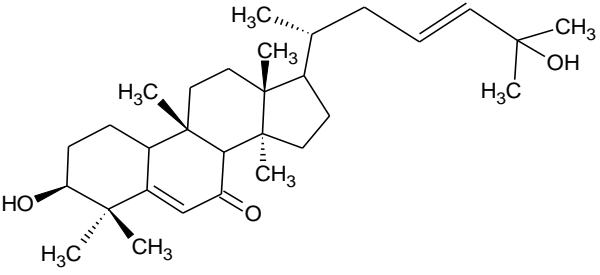
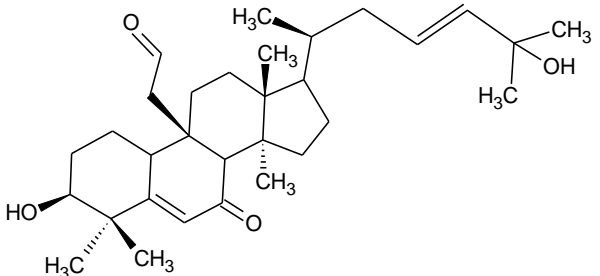
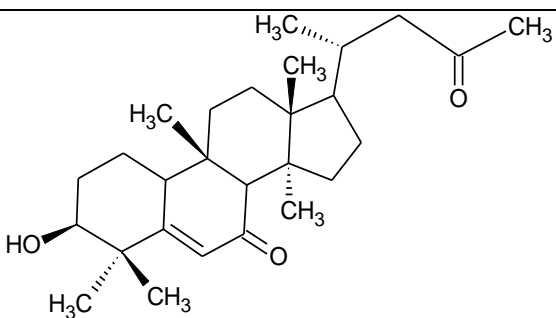
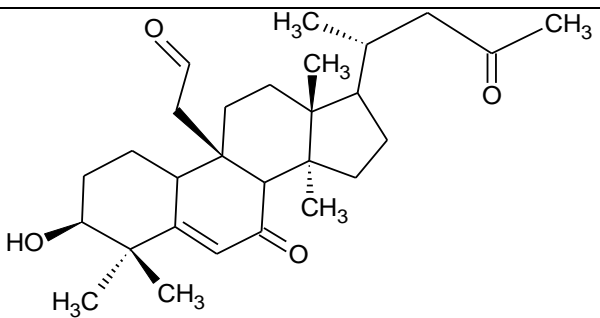
NOMBRE	TIPO	ESTRUCTURA
ACIDO β - HIDROXIMULTIFLOR A-8- EN-17-OICO	TRITERPENOIDE MULTIFLORANO	
CUCURBITA- 1(10),5,22,24 TETRAEN-3a-OL	TRITERPENOIDE CUCURBITANO	
5b,19b- EPOXICUCURBITA- 6,22,24-TRIEN-3a-ol	TRITERPENOIDE CUCURBITANO	

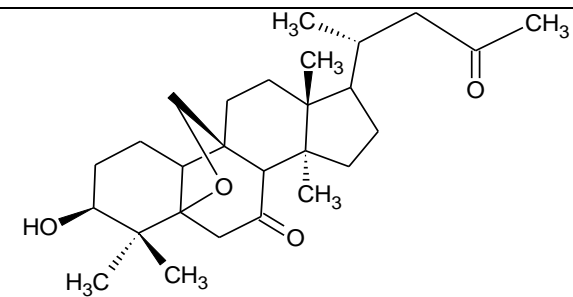
3. Frutos (Li et al., 2007; Keller et al., 2011; Yuan, 2008)

NOMBRE	ESTRUCTURA
<p>25β-ISOPROPENILCOLE-5, (6)-ENE-3-O-β-D-GLUCOPIRANOSIDO</p>	
<p>MOMORDICOSIDO L</p>	
<p>3β,7β,25-Trihidroxiucurbita-5,23(E)- dien-19-al Aglicona de Momordicosido U</p>	
<p>MOMORDICINA I</p>	 <p>R1: H R2: H</p>

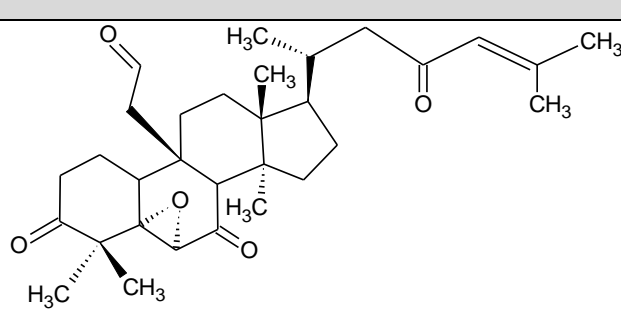
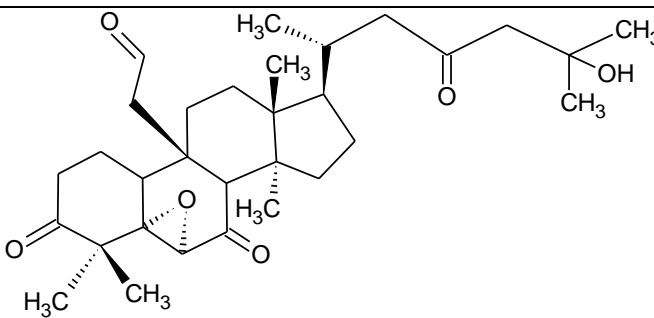
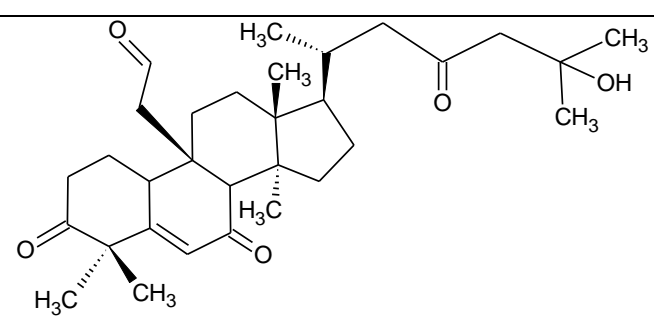
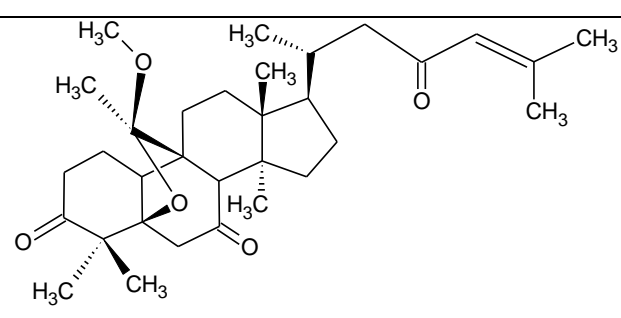
<p>MOMORDICINA II</p>	 <p>R1: H R2: GLU</p>
<p>(3), 3-hidroxicucurbita-5,24-dien-19-al-7,23-di-O-α-glucopiranosido</p>	 <p>R1: GLU R2: GLU</p>
<p>KUGUAGLICOSIDO G</p>	
<p>MOMORDICOSIDO Q</p>	 <p>R1:All R2: H</p>

4. Raices (Chen et al., 2008 ; Chen, et al., 2009)

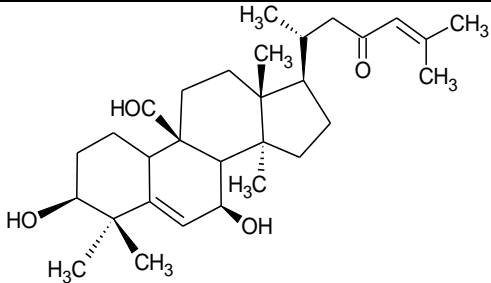
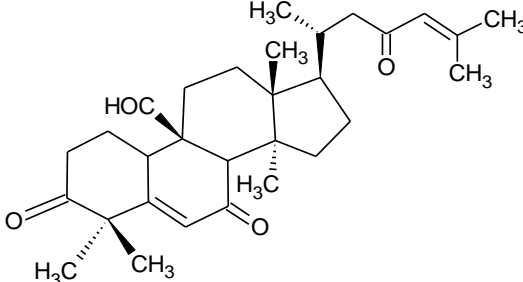
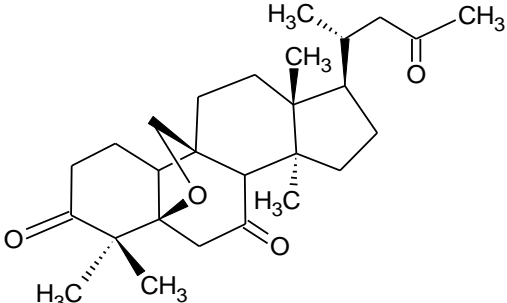
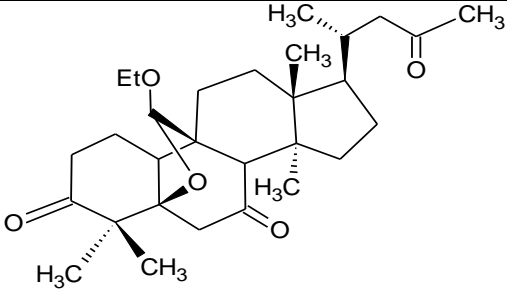
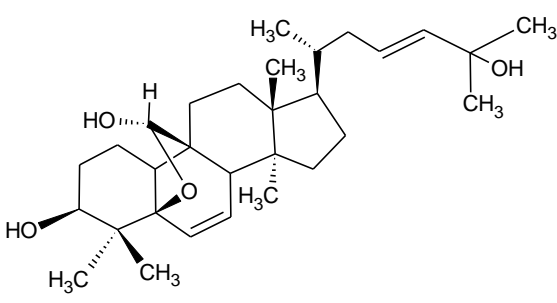
NOMBRE	FORMULA	ESTRUCTURA
KUGUACINA B	$C_{30}H_{48}O_3$	
KUGUACINA A	$C_{30}H_{46}O$	
KUGUACINA C	$C_{27}H_{42}O_3$	
KUGUACINA D	$C_{27}H_{40}O_4$	

KUGUACINA E	$C_{27}H_{42}O_4$	
-------------	-------------------	--

5. Partes aéreas (Chen et al., 2009 ; Panlilio et al., 2012)

NOMBRE	FORMULA	ESTRUCTURA
KUGUACINA F	$C_{30}H_{42}O_5$	
KUGUACINA G	$C_{30}H_{44}O_6$	
KUGUACINA H	$C_{30}H_{44}O_5$	
KUGUACINA I	$C_{31}H_{46}O_5Na$	

NOMBRE	FORMULA	ESTRUCTURA
KUGUACINA J	$C_{30}H_{46}O_3$	
KUGUACINA K	$C_{25}H_{34}O_6$	
KUGUACINA L	$C_{25}H_{36}O_4$	
KUGUACINA M	$C_{22}H_{28}O_4$	
KUGUACINA M	$C_{22}H_{28}O_4$	

NOMBRE	FORMULA	ESTRUCTURA
KUGUACINA N	$C_{30}H_{46}O_4$	
KUGUACINA O	$C_{30}H_{42}O_4$	
KUGUACINA P	$C_{27}H_{40}O_4$	
KUGUACINA Q	$C_{30}H_{42}O_4$	
KUGUACINA R	$C_{30}H_{48}O_4$	

NOMBRE	FORMULA	ESTRUCTURA
KUGUACINA S	$C_{30}H_{44}O_4$	
CHARANTAL	$C_{30}H_{48}O_4$	
CHARANTINA	3-o-D-Glucosil-sitosterol	
	3-o-D-Glucosil-estigmastadienol	

Adaptado de: La estación meteorológica : [Oregon scientific](http://www.mundomanz.com/meteo_ie/info_est), modelo WMR928NX conectada al servidor **Mundomanz.com** disponible en http://www.mundomanz.com/meteo_ie/info_est

Mes	Año	Temperatura(°C)		Humedad relativa (%)		Velocidad del viento(km/h)		N° dias con lluvia	Cantidad de precipitación (mm)	Periodo en que se produce precipitación (h)
		Mínima	Máxima	Minima	Máxima	Mínima	Máxima			
Agosto	2012	17,0	32,0	35	96	3,6	25,2	10	0,7	24
									2,0	24
									2,0	6
									0,3	24
									2,0	6
									0,5	24
									0,5	6
									27,0	24
									0,1	24
									0,1	24
Diciembre	2012	10,2	31,6	43	95	3,7	75,6	5	0,4	24
									2,0	24
									4,0	24
									11,0	24
									1,0	24
Enero	2013	16,6	32,8	41	94	3,6	28,8	2	0,2	24
									0,1	6

ANEXO 7-3. DIMENSIONES DE LOS FRUTOS DE LAS MUESTRAS DE RECOLECCION SILVESTRE Y DE CULTIVO DE *Momordica charantia* L.

Cantidad	19,25 g		11,28 g		4,168 g	
Muestra	S-LI Silvestre –epoca lluviosa		C-Se Cultivo- epoca seca		S-Se Silvestre-epoca Seca	
Medida	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)
1	24	18	25	12	20	13
2	25	22	20	17	18	13
3	22	15	19	13	27	11
4	25	17	12	10	20	12
5	27	14	13	11	17	10
6	21	13	15	11	17	11
7	18	12	15	12	16	10
8	35	15	14	10	20	13
9	20	13	14	11	5	10
10	17	17	17	11	13	9
11	23	13	18	11	23	14
12	27	14	18	12	9	10
13	23	14	18	12	18	12
14	25	13	17	12	13	11
15	15	12	17	10	13	7
16	22	14	17	10	17	13
17	33	20	18	11	8	8
18	14	9	15	9	20	7
19	18	12	15	10		
20	22	15	16	11		
21	23	15	14	9		
22	22	13	15	12		
23	16	12	12	9		
24	25	15	14	9		
25	22	18	17	10		
26	25	17	18	6		
27	13	11	12	9		
28	15	10	10	10		
29	13	11	13	9		
30	16	14	12	5		
31	15	12				
32	25	13				
33	17	12				

Cantidad	19,25 g		11,28 g		4,168 g	
Muestra	S-LI Silvestre –época lluviosa		C-Se Cultivo- época seca		S-Se Silvestre-época Seca	
Medida	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)	Largo (mm)	Ancho (mm)
34	20	12				
35	17	11				
36	18	13				
37	14	12				
38	13	10				
39	17	12				
40	15	11				
41	17	10				
42	13	11				
43	20	13				
44	15	12				
45	25	14				
46	23	13				
47	17	9				
48	18	9				
49	20	13				
50	18	12				
51	16	11				
52	15	12				
53	13	11				
54	13	10				
55	15	13				
56	13	10				
57	11	10				
58	11	9				
59	16	12				
60	12	12				
61	16	10				
62	15	12				
63	18	12				
64	12	9				
65	12	11				
66	18	13				
67	12	8				
68	10	8				
69	15	12				
70	11	10				
71	15	10				

ANEXO 7-4. ESPECIFICACIONES DE REFERENCIA PARA RECuentOS Y PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATÓGENOS EN MUESTRAS DE MATERIAL VEGETAL

Fuente	OMS (2007) WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues			Farmacopea Brasileira , 2010 Uso oral		Farmacopea Británica BP, 2014 Uso oral		
	Materias primas vegetales para ser procesados	Material vegetal para uso interno	Otros Materiales vegetales	Drogas vegetales sometidas a procesos de extracción en caliente	Drogas vegetales sometidas a procesos de extracción en frío	Productos con drogas para preparación de infusiones o decocciones	Productos con drogas vegetales – procesamiento reduce contenido MO	Productos con drogas vegetales – procesamiento no reduce contenido MO
Recuento total de microorganismos viables RTV	--	Máximo 10 ⁵ /g	Máximo 10 ⁵ /g	Máximo 10 ⁷ /g o ml	Máximo 10 ⁵ /g o ml	Máximo 10 ⁷ /g o ml Máximo 50000000 ufc/g o ml	Máximo 10 ⁴ /g o ml Máximo 50000 ufc/g o ml	Máximo 10 ⁵ /g o ml. Máximo 500000 ufc/g o ml
Hongos y levaduras	--	Máximo 10 ³ /g	Maximo 10 ³ /g	Máximo 10 ⁴ /g o ml	Máximo 10 ³ /g o ml	Máximo 10 ⁵ /g o ml. Máximo 500000 ufc/g o ml	Máximo 10 ² /g o ml. Máximo 500 ufc/g o ml	Máximo 10 ⁴ /g o ml. Máximo 50000 ufc/g o ml
Esporas fúngicas	Máximo 10 ⁵ /g	--	--	--	---	--	--	--
<i>Escherichia coli</i>	Máximo 10 ⁴ /g	Máximo 10 ³ /g	Ausencia /g	Máximo 10 ² /g	Máximo 10 ¹ /g	Máximo 10 ³ / g	Ausencia en 1 g o ml	Ausencia/ 1 g o ml
Enterobacterias	--	Máximo 10 ³ /g	Máximo 10 ³ /g	---	---	--	--	--
Bacterias Gram negativas	--	--	--	Máximo 10 ⁴ /g o ml	Máximo 10 ³ /g o ml	--	Máximo 10 ² /g o ml	Máximo 10 ⁴ /g o ml
Clostridium	--	Ausencia/ g	Ausencia /g	---	---	--	--	--
<i>Salmonella spp.</i>	--	Ausencia/g	Ausencia/g	Ausencia /10 g	Ausencia/10g	Ausencia /25 g	Ausencia en 25 g o ml	Ausencia en 25 g o ml
<i>Shigella</i>	Ausencia /g o ml	Ausencia/g	Ausencia/g	--	---	--	--	--

ANEXO 7-5. RESULTADOS DE RECuentOS Y PRESENCIA DE MICROORGANISMOS PATOGENOS EN MUESTRAS DE MATERIAL VEGETAL DE *Momordica charantia* L.

• Microorganismos Patógenos

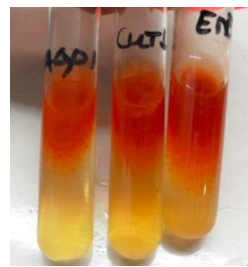
Muestras	Salmonella spp.			Pseudomona spp	Bacillus cereus	Staphylococcus aureus	Clostridium	E.Coli	Enterobacterias
Medio	Tetratationate Bismuto sulfito	Selenite Bismuto sulfito	S-S	Cetrimide		Baird Parker	TSN/ Anaerobiosis	VRBLA	EMB
S-LI-1	-	-	-	-	+	-	-	-	-
S-LI-2	-	-	Por confirmar	-	+	-	-	-	-
C-Se-1	Por confirmar	Por confirmar	+	-	+	-	-	-	-
C-Se-2	+	+	+	-	Por confirmar	-	-	-	-
S-Se-1	Por confirmar	Por confirmar	-	-	Por confirmar	-	-	-	-

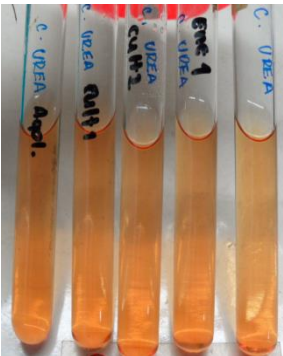

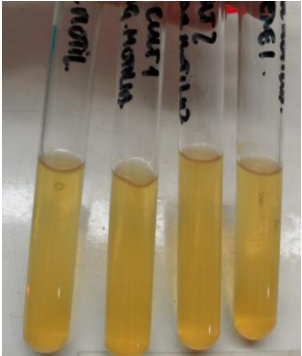
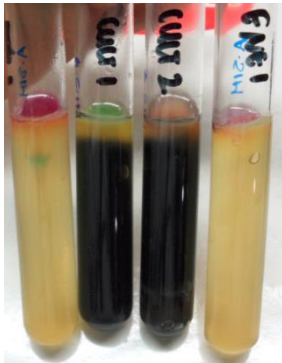
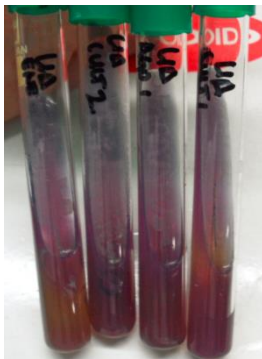
Los análisis cuyo resultado no es claro se confirmaron a través de aislamiento de colonias o pruebas bioquímicas

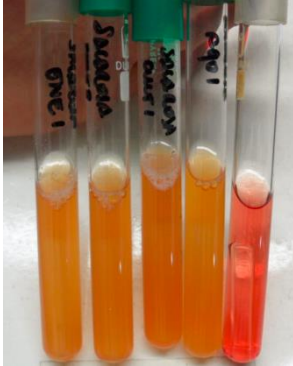

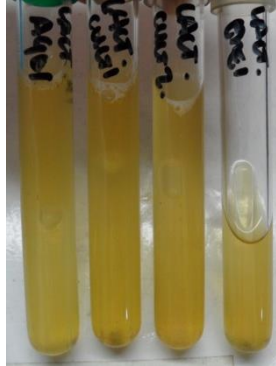
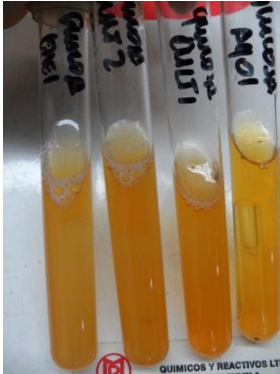
• Criterios de evaluación de pruebas bioquímicas- identificación Salmonella

Test/ sustrato	Microorganismo	Siembra	Resultado positivo	Resultado negativo
Caldo Nitratos	<i>Bacillus cereus</i>	Inocular el caldo con asa	Amarillo al fondo del tubo	Rojo al fondo del tubo
Caldo Glucosa	<i>Salmonella</i>	Inocular el caldo con asa	Cambio de color respecto al control producción de gas	No hay cambio de color respecto al control No hay producción de gas
Agar LIA	<i>Salmonella</i>	Por picadura en el fondo del agar y por estría en superficie	Fondo purpura/ superficie purpura Ennegrecimiento del medio	Violeta al fondo del tubo superficie amarilla. No se ennegrece el medio
Caldo úrea	<i>Salmonella</i>	Inocular el caldo con asa	Color purpura-rojo	No hay cambio de color respecto al control.
Caldo Voges Proskauer	<i>Salmonella</i>	Inocular el caldo con asa	Medio Color rojo/Rosado	No hay cambio de color respecto al control.
Agar motilidad	<i>Salmonella</i>	Por picadura hasta la mitad del agar	Turbidez o crecimiento más allá de la línea de siembra Cambio de color a púrpura del medio Color rojo luego de adicionar reactivo de Erlich	Crecimientos solo en la línea de siembra Color amarillo El color del reactivo revelador permanece incoloro

Test/ sustrato	Microorganismo	Siembra	Resultado positivo	Resultado negativo
Agar SIM	Salmonella	Por picadura hasta la mitad del agar	Crecimiento difuso que se disemina a partir del punto de inoculación. Ennegrecimiento del medio Color rojo en la superficie tras adición de Indol	Crecimiento en la línea de siembra Medio sin cambio de color Color amarillo en la superficie tras adición de Indol
Agar citrato Simmons	Salmonella	Por picadura en el fondo del agar y por estría en superficie	Crecimiento y color azul	No hay crecimiento No hay cambio de color (verde) respecto al control
Caldo sacarosa	Salmonella	Inocular el caldo con asa	Color amarillo y /o gas	No hay cambio de color No hay producción de gas
Caldo lactosa	Salmonella	Inocular el caldo con asa	Color amarillo y /o gas	No hay cambio de color No hay producción de gas

Medio	<i>Bacillus cereus</i>	Foto
	Caldo nitratos	
S-LI-1	+	
C-Se-1	+	
S-Se-1	+	

	<i>Salmonella</i>				
Medio	Caldo Urea	Caldo VP	Agar motilidad	Agar SIM	Agar LIA
S-LI-1	-	-	-	(-) Sulfito reductor (+) producción de Indol	-
C-Se-1	-	+	-	(+) Sulfito reductor (+) producción de Indol	+
C-Se-2	-	-	-	(+) Sulfito reductor (+) producción de Indol	-
S-Se-1	-	+	-	(-) Sulfito reductor (+) producción de Indol	+
					

	<i>Salmonella</i>			
Medio	Caldo Sacarosa	Agar Citrato Simmons	Caldo lactosa	Caldo Glucosa
S-LI-1	+	+	-	+
C-Se-1	+	+	-	+
C-Se-2	+	+	-	+
S-Se-1	+	+	-	+
				

ANEXO 7-6 PROPUESTA DE MONOGRAFÍA PARA PARTES AÉREAS *Momordica charantia* L.



Laura Carlos, 2012, Valle del Cauca

1. Nombre científico

Momordica charantia L. Cucurbitaceae (Ministerio de protección social, 2008)

2. Nombres comunes

Pais	Nombre	Fuente
Colombia	Balsamina Bejuco de coje Subicogen Pepinillo Pepino cimarrón	(Ministerio de protección social, 2008)
Barbados /Bahamas Jamaica /Trinidad	Cerasee	(Robineau, 2007)
Costa Rica /Guatemala	Sorosí	(Robineau, 2007)
Dominicana	Kokoali	(Robineau, 2007)
Haiti	Asorosí	(Robineau, 2007)
Honduras	Calaica	(Robineau, 2007)
Puerto Rico /Rep. Dominicana Venezuela	Cundeamor	(Robineau, 2007)
Brasil/Cuba /Mexico Puerto Rico /USA Tailandia, Bahamas, Australia, USA	Balsam pear Bitter gourd Melón amargo Melao de Sao Caetano	(Ross, 2003)
India, Perú	Balsamina	(Ross, 2003)
Panamá	Balsamino	(Ross, 2003)
India,USA	Karela	(Ross, 2003)

3. Descripción de la droga

Hojas, tallos, flores y frutos (Ministerio de protección social, 2008)

4. Origen

Es originaria de Africa y fue introducida en Europa en el siglo XVIII. En América se introdujo posteriormente donde se ha adaptado favorablemente debido a las condiciones climáticas (Ross, 2003).

3. DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA

Material vegetal entero fresco

Pertenece al grupo de las plantas Angiospermas. Es una planta herbácea y trepadora que crece 6-8 metros de largo, muy ramificada, con tallos estriados y zarcillos rizados.



Laura Carlos, 2012, Valle del Cauca

Hojas

Son hojas simples de 4- 5 cm de longitud, color verde, rastreras, suaves y no presentan vellosidades. Son unifoliadas, pecioladas, de venación reticulada. Se encuentran de forma alterna y son caulinares. Las hojas tienen 5 lóbulos que cuales los dos ubicados en la base de la hoja se subdividen en 2 lóbulos cada uno; son levemente dentadas. Las hojas adultas llegan a medir 7-10 cm de longitud y 5-7 cm de ancho, de color verde oscuro. Los peciolo son delgados y miden de 1-3 cm de largo.

Primera hojas palmeadas no lobuladas. Configuración acorazonada. Los filos son pubescentes y suaves.



Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca

Tallos y zarcillos

Los tallos son verdes, delgados y con vellosidades. Son rastreros y presentan nudos y yemas terminales con zarcillo. Presenta una raíz principal leñosa de la cual se desprenden raíces laterales.



Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca

Flores

Presenta cáliz diferenciado de la corola. Son flores solitarias, unisexuales de 5 pétalos amarillos, redondeados y cóncavos de 1 cm de largo. Presenta sépalos de 5mm. La Flor es dialipétala, cariofilácea y pluricarpelar.



Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca

<p>Frutos</p> <p>Son espinosos de color verde y durante la maduración adquieren color naranja. Son alargados de dimensiones entre 5-35 mm de largo y 5-22 mm de ancho de acuerdo a su estado de desarrollo.</p>	 <p>Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca</p>
<p>Semillas</p> <p>Las semillas son elípticas con cubierta de color rojo de máximo 10 mm de longitud. Se encuentran alrededor de 15-20 semillas en cada fruto maduro.</p>	 <p>Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca</p>

Material vegetal entero seco

El material fibroso compuesto por tallos delgados color amarillo y hojas verdes rugosas y friables. Se evidencian algunos zarcillos y flores amarillas secas.

Los frutos se observan como capsulas de color amarillo-naranja friables.



Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca




Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca



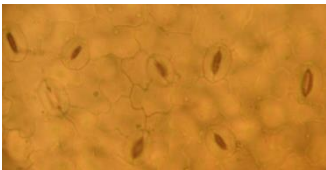
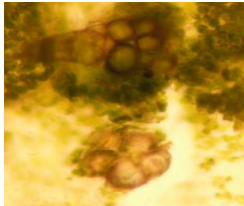


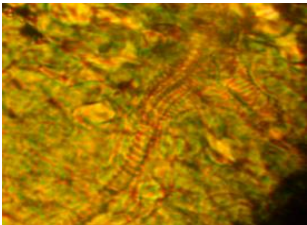
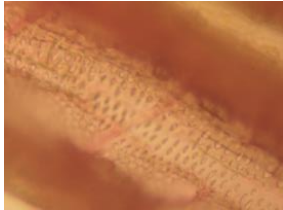
Laura Carlos, 2012 Valle del Cauca


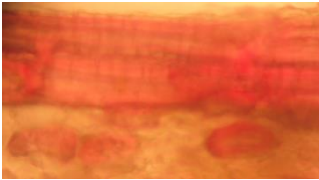
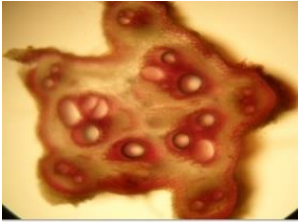

Material vegetal molido seco

Atributo	Material vegetal	
Color	Predominantemente verde con mezcla de partículas amarillas	
Olor	Herbáceo Produce un sabor amargo al oler	
Sabor	Amargo	
Aspecto físico	Mezcla material fibroso/ partículas friables	

4. DESCRIPCION MICROSCÓPICA

Se toma una muestra de cada uno de los materiales y se hidrata con agua. Los tejidos se obtienen mediante cortes transversales y longitudinales de tallos y hojas. Algunos tejidos es necesario clarificarlos mediante humectación con solución de hipoclorito de sodio al 5% durante 1 hora. Se colocan las muestras sobre láminas de vidrio cubiertas con laminillas. La observación se realiza bajo el microscopio con lentes 4x ,10x, y 40 x.

Descripción	Fotografía	Descripción	Fotografía
Estomas anomocíticos, únicamente en el envés Epidermis de paredes sinuosas y onduladas 40x Hojas		Abundantes tricomas no glandulares multicelulares uniseriados, inclinados, unidos a la epidermis por una base de 2 a 5 células 40x Hojas	
Abundantes tricomas no glandulares multicelulares uniseriados, inclinados, unidos a la epidermis por una base de 2 a 5 células 40x Hojas		Escasos tricomas glandulares de pedúnculo multicelular uniseriado y glándula multicelular 40x Hojas	
Vasos espiralados en hojas 40x		Vasos reticulados en tallos Tinción con fruroglucinol 40x	

<p>Celulas pétreas en tallos Tinción con fluoroglucinol 40x</p>	 	<p>Organización de grupos vasculares Tinción con fluoroglucinol 10x</p>	
<p>Tejido conductor y esclerénquima Tinción con fluoroglucinol 40x</p>	 <p>Xilema ←</p> <p>Floema ←</p> <p>Fibras del periciclo ←</p>		

5. COMPOSICIÓN QUÍMICA Y NUTRICIONAL

(Robineau, 2007; Yuwai et al., 1991; AVRDC The World Vegetable Center, Bitter gourd IV leaflet N°10)

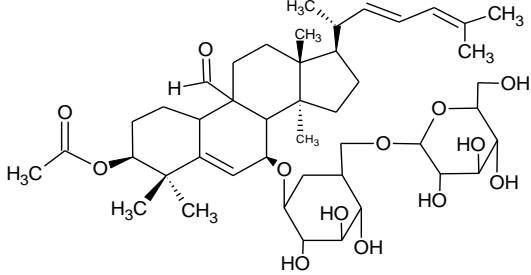
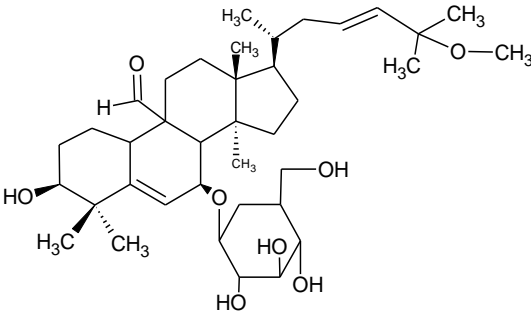
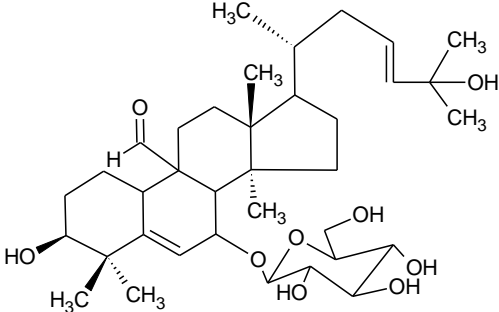
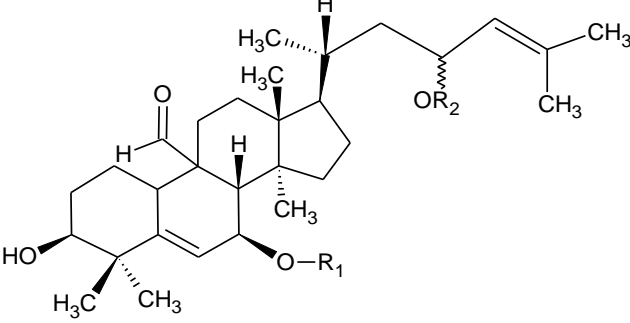
Componente	Partes aéreas	Frutos
Humedad	84,6%	83-92%
Proteínas	5,6%	1,5-2%
Grasas	0,6%	0,2-1%
Carbohidratos	7%	4-10,5%
Cenizas	2,2%	NR
fibra	1,6%	0,8-1,7%
Fosforo	54 mg	38-70%
Sodio	19 mg	NR
Hierro	5 mg	1.8-2 mg
Calcio	288 mg	20-23 mg
Potasio	510 mg	NR
Caroteno	5,08 mg	NR
Tiamina	0,13 mg	NR
Rivoflavina	0,45 mg	NR
Niacina	1,5 mg	NR
Acido ascórbico	170 mg	NR

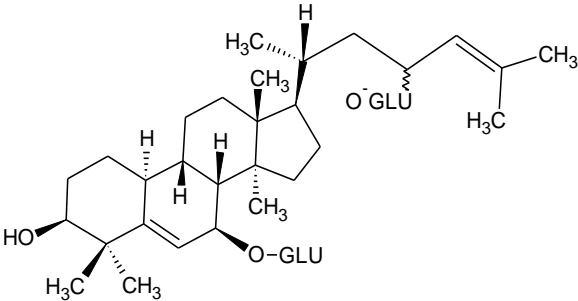
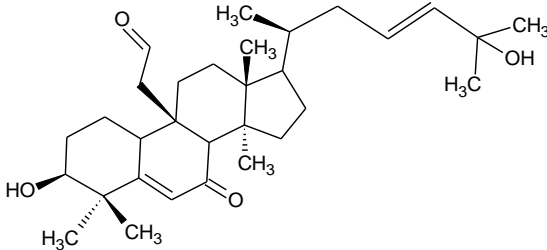
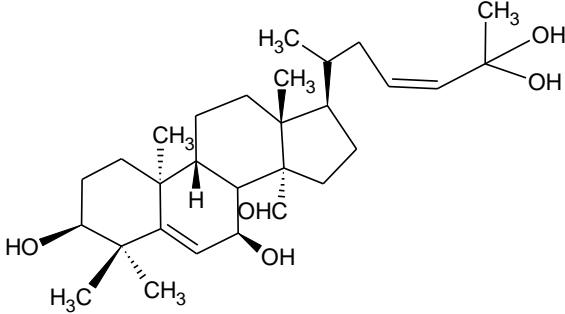
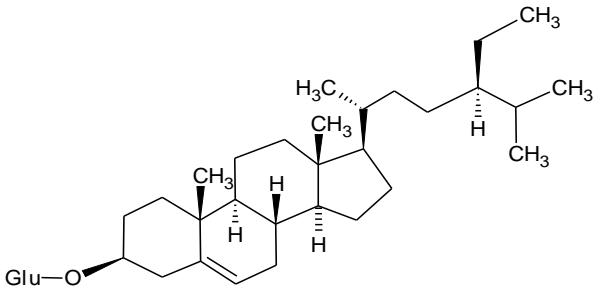
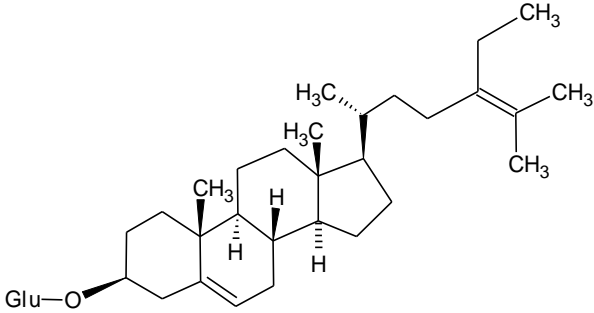
6. REQUERIMIENTOS AGROTECNOLÓGICOS (Ross, 2003; Felix, 2010)

Luz	Se requiere un aprovechamiento máximo del sol en una zona tropical. Se reporta un porcentaje de radiación solar de 816,33h/año.
Suelo	Crecen en áreas planas en una altura de 1000-1500m. Se requiere un balance de nutrientes para prevención de plagas, enfermedades y debilidad de la planta. Dentro de los nutrientes más importantes se reporta el requerimiento de Nitrógeno, fosforo y potasio. Crece favorablemente en suelos fértiles bien drenados de textura arcillosa-arenosa o franco-arenosa con pH ligeramente ácido (5,5-6,7) a una profundidad de 50-150 cm. Se recomienda la utilización de "nitrógeno de amonio" a excepción de la floración y la maduración, y abonos orgánicos.
Temperatura	Son indispensables las condiciones de temperatura cálida del aire y del suelo para garantizar la germinación y desarrollo de la planta. Requiere un mínimo de temperatura de 18°C durante el crecimiento temprano con temperatura óptima de 24-27°C. Se encuentra reportado buen crecimiento en zona húmeda con temperatura del suelo de 28-32°C a 10 cm de profundidad}. Con Temperaturas superiores a 37°C los frutos se ven afectados y con temperaturas bajo cero la planta muere.
Humedad	La planta requiere de riego regular para mantener la humedad aproximadamente 50 cm de profundidad y así alcanzar un alto rendimiento. La humedad del suelo puede darse por la lluvia pero en épocas donde hay excesiva humedad debe controlarse el drenaje. En el ambiente un exceso de humedad podría favorecer el crecimiento microbiano e impedir la germinación y desarrollo de las raíces por el déficit de oxígeno. Se reporta humedad 85-90%.

7. Compuestos químicos más representativos

(Lin, 2011; Liu et al., 2010; Li et al., 2007; Keller et al., 2011; Yuan, 2008 ; Chen et al., 2008)

Nombre	Estructura
TAIWACINA A	
MOMORDICOSIDO K	
MOMORDICOSIDO L	
MOMORDICINA	 <p data-bbox="1169 1753 1323 1795">R1: H R2: H</p>

KUGUAGLICOSIDO G	
KUGUACINA A	
CHARANTAL	
CHARANTINA	<p>3-o-D-Glucosil-sitosterol</p> 
	<p>3-o-D-Glucosil-estigmastadienol</p> 

A través de estudios fitoquímicos, algunos autores han reportado en general compuestos fenólicos (ácidos fenólicos y flavonoides), glicósidos triterpenoides, saponinas, glicósidos esteroidales y una fracción de alcaloides no caracterizados. Raman y Lau reportaron adicionalmente compuestos identificados como charantina, Momordicosidos (A, B, C, D, E, E-1, EX, F, F-1, F-2, G, H, I J, K, L Q.), Momordicinas (I, II y III) y proteínas (Raman y Lau, 1996).

En raíces específicamente, se han aislado algunos compuestos triterpénicos conocidos como Kuguacinas A-E (Chen et al., 2008) mientras que en partes aéreas se han reportado Kuguacina F- S y charantal.

En los frutos se han identificado triterpenos como Taiwacinas, alcaloides, fenoles, taninos, saponinas, además de terpenoides cucurbitanos, responsables de la actividad (Yadav et al., 2010). La monografía de OMS (2009) reporta adicionalmente Goyaglicosidos A-H, y Goyasaponinas I-III. En las semillas adicionalmente se han identificado α y β momorcharinas, momordina y zeatina (Robineau, 2007).

8. Indicaciones

Coadyuvante en el tratamiento de la diabetes no insulino-dependientes (Ministerio de protección social, 2008)

9. Actividad farmacológica y ensayos clínicos

Tanto las partes aéreas como el fruto tienen efecto abortifaciente, antitumoral, citostática, antiviral, antibacterial, principalmente (Tylor, 2002). A continuación se relacionan los estudios donde se ha evaluado la actividad farmacológica de extractos de las partes aéreas y de los frutos:

Parte de la planta	Actividad farmacológica	Tipo de estudio	Descripción	Referencia
Todas las partes (fruto , semillas, hojas)	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Estudios en ratas sin diabetes.	Bailey et al., 1985 Day et al., 1990 Ali et al., 1993 Shibib et al., 1993 Cakici et al., 1994 Sarkar et al., 1996 Jayasooriya et al., 2000
Extractos de todas las partes de la planta. (fruto ,semillas, hojas).	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Estudio en ratas y ratones con diabetes inducida por Aloxano	Sharma et al., 1960 Akhtar, 1982 Karunanayake et al., 1984 Singh et al., 1989 Pari et al., 2001 Rathi et al., 2002 Kar et al., 2003 Virdi et al., 2003
Extractos de todas las partes de la planta. (fruto ,semillas, hojas).	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Estudio en ratas, conejos y ratones con diabetes inducida por Estreptozotocina	Kedar and Chakrabarti, 1982 Bailey et al., 1985 Day et al., 1990 Karunanayake et al., 1990

Parte de la planta	Actividad farmacológica	Tipo de estudio	Descripción	Referencia
				Higashino et al.,1992 Shibib et al.1993 Sarkar et al., 1996 Ahmed et al., 1998 Sitasawad et al., 2000 Ahmed et al., 2001 Grover et al., 2002 Rathi et al., 2002
Extracto del fruto en agua	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Ensayo clínico con nueve pacientes diabéticos	Leatherdale et al.,1981
Suspensión de la pulpa del fruto	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Ensayo clínico con 100 pacientes diabéticos.	Ahmad et al.,1999
Inyección subcutánea de proteína p-insulina pura	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Ensayo clínico controlado a nueve pacientes diabéticos no insulino dependientes (seis pacientes con diabetes infantil, uno con al inicio de la madurez y dos con diabetes química)	Baldwa et al.,1976.
Inyección subcutánea de polipéptido-P	Actividad hipoglicemiante	<i>In vivo</i>	Ensayo clínico con 19 pacientes diabéticos menores y adultos.	Khanna et al.,1981
Extracto de hojas en agua, metanol y etanol)	Actividad antibacterial	Ensayo de laboratorio	Evaluada frente <i>Escherichia coli</i> , <i>Salmonella paratyphi</i> , <i>Shigella dysenterae</i> y <i>Streptomyces griseus</i>	Omeregbe et al.,1996 Ogata et al.,1991.
Extracto de la planta entera	Actividad antiparasitaria	Ensayo de laboratorio	Evaluada frente a <i>Entamoeba histolytica</i>	Khan et al., 1998
Extracto de la planta entera	Actividad antimicrobiana	Ensayo de laboratorio	Evaluada frente a <i>Helicobacter pylori</i> . Se determinó la Concentración mínima inhibitoria	Yesilada et al.,1999
Extracto de hojas	Antimicrobiana	Ensayo de laboratorio	Evaluación frente a <i>Mycobacterium tuberculosis</i> utilizando el método de análisis de susceptibilidad a través del sistema BACTED 460	Frame et al.,1998
Extracto crudo y fracciones purificadas	Actividad anticancerígena	<i>In vivo</i> <i>In vitro</i>	Evaluado contra leucemia linfocítica, linfoma, coriocarcinoma, melanoma, cáncer de mama, tumores de la piel, cáncer de próstata, lengua, laringe y linfoma de Hodgkin	Licastro et al., 1980 Ng et al., 1994 Battelli et al., 1996 Ganguly et al., 2000 Sun et al., 2001

Parte de la planta	Actividad farmacológica	Tipo de estudio	Descripción	Referencia
Fracción rica en saponinas de Extracto etanólico y saponinas purificadas	Actividad antidiabética	<i>In vitro</i>	Evaluated por medición de la secreción de insulina en células β incubadas con el extracto	Keller et al, 2011 ^a
Extractos del frutos en agua, etanol, metanol cloroformo y hexano	Actividad hipoglicemiante	<i>In vitro</i>	Estudio con ratas no diabéticas. Se induce hiperglicemia con administración de glucosa. Se evaluó el efecto de los extractos de forma independiente y en uso concomitante con Glimepirida.	Yadav, 2010
Extractos y fracciones de hojas	Actividad Antibacterial	Ensayo de laboratorio	Evaluación de actividad antimicrobiana <i>S. Aureus</i> / <i>B. Cereus</i> / <i>E.Coli</i>	Costa, 2011

10. TOXICIDAD

La ingesta de todas las partes aéreas de la planta reporta baja toxicidad. En cuanto al consumo del fruto no manifestó signos de nefrotoxicidad ni hepatotoxicidad en animales cuando fué administrado en dosis bajas por menos de dos meses, sin embargo se evidencia en algunos estudios que tanto el fruto como las semillas tienen mayor toxicidad que las demás partes aéreas. En cuanto a los extractos, se ha documentado que tras la administración intraperitoneal o intravenosa de extractos de la planta existe evidencia de alta toxicidad e incluso la muerte (Grover, 2004).

Según lo reportado en un estudio (Lagarto et al., 2008) los extractos acuosos e hidroalcohólicos de *Momordica charantia* L. se ensayaron en ratas para evaluar toxicidad aguda oral e irritación dérmica y ocular. Se administró una dosis de 2000 ml/kg de peso mediante un régimen de dosificación con previo ayuno. Al finalizar el estudio no se observó la muerte de los animales ni alteración de los órganos o tejidos analizados. La prueba de irritación dérmica indicó que no hubo alteraciones en la piel de los animales y se clasificaron los extractos como no irritantes. En pruebas de irritación ocular no se produjeron alteraciones en iris ni conjuntiva, pero si se generaron lesiones en la córnea que desaparecieron con el tiempo. Los extractos se clasificaron como no irritantes.

Dos estudios diferentes reportan DL₅₀ de extractos hidroalcohólicos de partes aéreas por administración intraperitoneal en ratones, uno mayor a 1000 mg/kg y el otro igual a 681 mg/kg. La DL₅₀ de extractos hidroalcohólicos de fruto fue de 681 mg/kg, luego de administración por vía intraperitoneal en ratones. Los extractos acuosos de semilla, administrados por vía intraperitoneal a

ratas evidenciaron una DL₅₀ de 25 mg/kg (Taylor, 2002).

A continuación se relacionan algunos estudios diseñados para evaluar los efectos adversos tras la administración del extracto en animales:

Evaluación	Parte de la planta	Descripción	Resultado	Referencia
Hepatotoxicidad	Jugo de la planta y extracto de semillas	Administración diaria 10ml/kg de peso por 30 días en ratas	No se observó elevación de las enzimas hepáticas ni defectos histológicos.	Tennekoon et al., 1994.
Efecto abortivo	Extracto hidroetanólico de partes aéreas	Administración por vía oral a ratas preñadas a dosis de 100 mg/kg	Inactivo	Taylor, 2002
Efecto embriotóxico	Extractos acuosos de hojas	Administración por vía oral a ratas a dosis de 200 mg/kg y 500 mg/kg	Inactivo	Taylor, 2002
Toxicidad del jugo de la planta	Jugo de la planta	Administración oral una o dos veces al día de jugo de la planta 6ml/kg de peso a 6 conejos	5 animales murieron entre 5 - 25 días.	Sharma et al., 1960.
Toxicidad del jugo de la planta	Jugo de la planta	Ratas preñadas a quienes se les administró oralmente 6ml/kg de peso	Muerte de las ratas pocas horas después de la administración	Zhang, 1992
Toxicidad del jugo de la planta	Jugo de la planta	Ratas con diabetes inducida con aloxano a quienes se les administró oralmente 6ml/kg de peso.	80-90% de las ratas murieron entre 5 y 23 días.	Zhang, 1992

Toxicidad en Humanos

La toxicidad en humanos no ha sido ampliamente estudiada, sin embargo se ha reportado que con la administración oral en adultos de 50 ml del jugo no hay efectos adversos ni fatales. La administración de jugo del fruto o extracto seco (equivalente a 250-500 g del fruto) en pacientes diabéticos, condujo a dolor abdominal y diarrea (Raman y Lau, 1996).

Yukes y Balick en 2010, refieren que el consumo de la decocción del fruto por vía oral en cantidades equivalentes a 500 mg por persona no evidenció signos de toxicidad, sin embargo relatan inhibición del desarrollo fetal luego de su administración de extracto acuoso de la planta entera, a mujeres embarazadas, en dosis de 15 mL/pesona/día.

Se ha reportado el riesgo de potencial reacción fatal en humanos evidenciada en un coma

hipoglicémico, en niños que ingirieron extracto acuoso de las hojas y partes aéreas de *Momordica charantia* L. Los menores presentaron convulsiones dos horas después de su administración en ayuno, sin embargo se recuperaron tras un tratamiento médico (Hulin, et al.,1988; Basch et al., 2003).

Según la monografía OMS para frutos de *Momordica*, a pesar que se han realizado estudios clínicos de actividad y toxicidad, no existen ensayos aleatorios ni ciegos, y los que se encuentran disponibles, no han sido desarrollados de forma sistemática. Por lo anterior es necesario desarrollar estudios ciegos, controlados mediante un placebo, que permitan un mayor soporte en la evaluación de seguridad y eficacia.

Es importante mencionar que tanto los frutos verdes como las semillas, están reportados dentro del listado de plantas tóxicas del INVIMA de la sala especializada de productos naturales, actualizado en octubre de 2013 (establecido en el acta 09 de 2012 numeral 3.3) por su potencial tóxico, atribuido a algunos triterpenoides cucurbitanos (momordicosidos y momordicinas) y lectinas (momodina). Se reporta la dosis letal del jugo LD50: 9 mg/kg y del extracto alcoholico 36 mg/kg.

11. Contraindicaciones

Debido a retraso del desarrollo fetal y potencial riesgo de causar aborto, no debe ser usado durante el embarazo. No debe ser administrado oralmente durante la lactancia o administrada en niños menores de 3 años.

12. Analisis fisicoquímicos

Análisis	Resultado
<i>Humedad</i>	Máximo 14,0%
<i>Cenizas totales</i>	Máximo 15,0%
<i>Cenizas insolubles en acido</i>	Máximo 1,2%
Material extraíble en agua	81,5-273,8%
Material extraíble en etanol 96%	66,1%-173,7%
Material extraíble en agua:etanol 50:50	110,6-283,7%
Material extraíble de frutos en mezcla agua:etanol 50:50	140,1-155,9%
Índice de espuma	200-250

13. Metabolitos Secundarios

Metabolitos	Resultado
Flavonoides/ compuestos fenólicos	Presente
Compuestos terpénicos/esteroidales	Presente
Saponinas	Presente

Compuestos Cardiotónicos	Ausentes
Compuestos Antracénicos	Ausentes
Alcaloides	Ausentes

14. Análisis Microbiológicos

Análisis Microbiológico	Resultado
Recuento Total Viables (ufc/g)	300 x10 ⁵
Hongos y levaduras (ufc/g)	300 x10 ³
Enterobacterias (ufc/g)	300 x10 ⁴
<i>E.Coli</i>	Ausente
<i>Salmonella spp</i>	Ausente
<i>Pseudomona spp</i>	Ausente
<i>Clostridium perfringes</i>	Ausente
<i>Stapylococcus aureus</i>	Ausente
<i>Bacillus cereus</i>	Ausente

15. METODOLOGÍAS PARA EL ANÁLISIS DE LA MATERIA PRIMA

Humedad

Se utiliza la metodología sugerida en la guía control de calidad para material herbal de OMS, 2011.

Condiciones

- Cantidad de material: 1 g +/- 5%
- Temperatura: 105°C ± 5°C
- Tiempo: 3 horas o hasta variación menor a 5 mg

$$\% \text{ Humedad} = \frac{(P_{cmv} - P_{cv})}{(P_{mv})} * 100$$

P_{cmv}= peso de cápsula con material vegetal después de proceso de secado

P_{cv}= peso de la cápsula vacía

P_{mv}= peso del material vegetal inicial

Cenizas totales

Se utiliza la metodología sugerida en la guía de control de calidad para material herbal de OMS, 2011.

Condiciones

Peso material vegetal: Pesar exactamente una cantidad de material entre 1-2 g

Temperatura: 500-600°C

Tiempo: 4 horas

$$\% \text{ cenizas totales} = \frac{(P_{crmv} - P_{crv})}{(P_{mv})} * 100$$

P_{crmv}= peso del crisol con material vegetal después de

incineración

P_{crv}= peso del crisol vacío

P_{mv}= peso del material vegetal

Cenizas insolubles en ácido

Se utiliza la metodología sugerida en la guía control de calidad para material herbal de OMS, 2011.

Temperatura: 500°C-600°C

Tiempo: 4 horas

$$\% \text{ cenizas insolubles} = \frac{(P_{fcr})}{(P_{ct})} * 100$$

P_{fcr}= peso final de crisol después de incineración

P_{ct}= peso de cenizas totales

Material extraíble

Se utiliza la metodología sugerida en la guía control de calidad para material herbal de OMS, 2011 para el proceso de extracción en frío.

Se realizan extractos en agua destilada, mezcla agua etanol (50:50) y etanol 96%.

$$\text{Material extractable} \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{(P_{ce} - P_{cv})}{P_{mv} (g)}$$

P_{ce}: peso de cápsula/ frasco con el extracto

P_{cv}: peso de la capsula vacía

P_{mv}: peso del material vegetal

Índice de espuma

Se utiliza la metodología sugerida en la guía control de calidad para material herbal de OMS, 2011.

Se toma el valor de la dilución con mayor altura de espuma y el volumen de extracto (Ve) para el cálculo de índice de espuma

$$IE = \frac{1000}{(V_e)}$$

Detección de saponinas por hemólisis.

• Preparación del extracto de material vegetal

Se pesan 2,5 g de material vegetal y se extraen durante 30 minutos a 80°C con una porción inicial de 15 ml de una mezcla etanol-agua (1:7) y se filtra. Posteriormente se continúa la extracción 15 minutos a 80°C con una porción de 10 ml, se filtra el extracto y se junta con la porción anterior reuniendo 20 ml. Se adiciona 1 g de óxido de magnesio y se deja en baño maría durante 15 minutos. Se filtra en caliente por un papel filtro utilizando 10 ml de etanol 96% caliente para lavar el residuo. El extracto obtenido es concentrado a 3 ml.

Suspensión de eritrocitos

Se toma 1 ml de sangre fresca con citrato de sodio y se lleva a volumen 50 ml con buffer de fosfatos pH 7.4.

Patrón

El patrón se prepara utilizando una solución de saponinas al 1% en mezcla agua: etanol (1:7).

Ensayo

Se realiza el ensayo usando las siguientes mezclas, las cuales se agitan levemente sin formar espuma. Se realiza agitación 30 minutos después y se deja en reposo a temperatura ambiente durante 6 horas, después de lo cual se revisa la hemólisis total evidenciada por transparencia de la solución.

Nº Tubo	Volumen Extracto (ml)	Volumen de buffer fosfatos (ml)	Volumen de suspensión de eritrocitos (ml)
1	0,10	0,90	1,00
2	0,20	0,80	1,00
3	0,50	0,5	1,00
4	1,00	N/A	1,00
Patrón	1,00	N/A	1,00

Proceso de extracción en caliente

Se toman 25 g de material vegetal de cada una de

las muestras y se humeden con 50 ml de solvente (agua, mezcla agua etanol 50% o Etanol 96%). Se adicionan 100 ml de solvente y se colocan en baño maría durante 1 hora en reflujo a 80°C. Se filtra con papel filtro en un embudo obteniendo la porción de filtrado N°1. Se adicionan 100 ml de solvente nuevamente, se coloca el balón a ebullición durante 1 hora y se filtra en vacío con embudo buchner. Por último se lava el residuo seco con 20 ml de solvente, obteniendo la porción de filtrado N°2.

Se juntan las dos porciones de filtrado las cuales se someten a tratamiento para sequedad dependiendo del solvente utilizado. Los extractos acuosos se almacenan en frascos de vidrio previamente tarados, se congelan y se secan en liofilizador. Los extractos Hidroalcohólicos y etanólicos, se colocan en rotavapor para concentrarlos aproximadamente a 25 ml. Posteriormente son transferidos a una cápsula previamente tarada y se secan en estufa a 40- 50°C hasta sequedad. Se pesa cada cápsula después del enfriamiento y se determina el rendimiento del proceso de extracción.

$$\text{Material extractable} \left(\frac{mg}{g} \right) = \frac{(P_{ce} - P_{cv})}{P_{mv} (g)}$$

Pce: peso de cápsula/ frasco con el extracto

Pcv: peso de la capsula vacía

Pmv: peso del material vegetal

El resultado se reporta como miligramos (mg) de material extractable para cada solvente o mezcla solvente por cada gramo (g) de material vegetal seco.

CROMATOGRAFIA EN CAPA DELGADA (CCD)

Compuestos terpénicos/esteroidales

Extracto etanólico (96%)

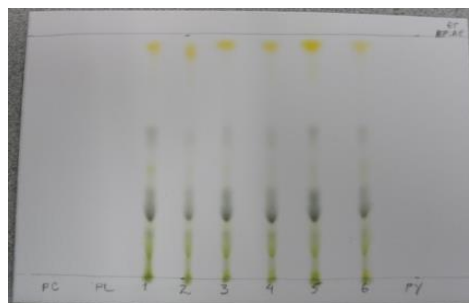
FM: éter de petróleo:acetato de etilo (8:2)

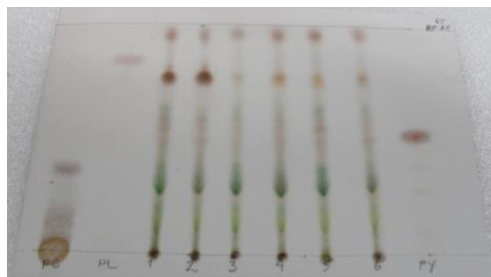
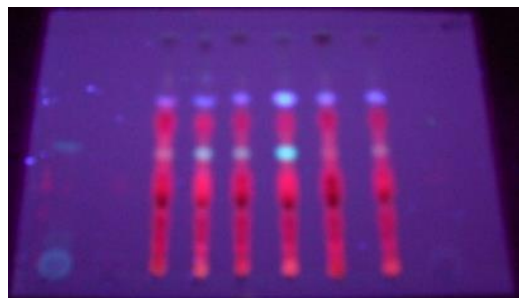
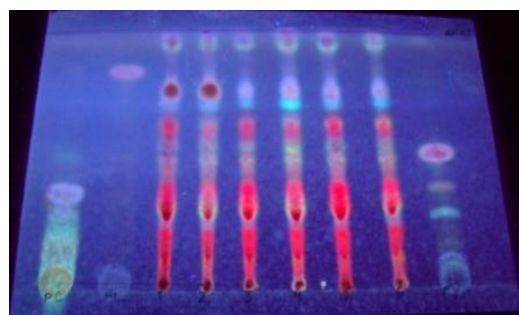
Revelador: Reactivo Lieberman Burchard

Rf: 0,40; 0,46; 0,50; 0,52; 0,56; 0,66; 0,68; 0,72; 0,94

Placas de CCD

Antes de revelar (luz visible)



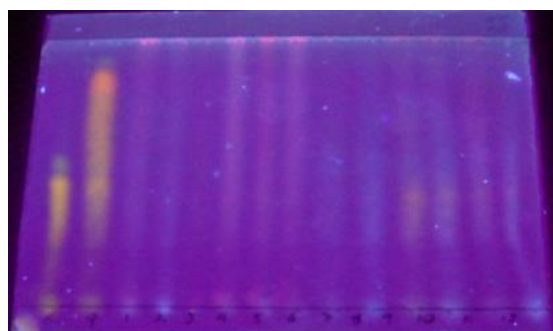
Después de revelar (luz Visible)**Antes de revelar (Luz UV 365 nm)****Después de revelar (365 nm)****Flavonoides**

Extracto etanólico (96%)

FM: Acetato de etilo-ácido acético-ácido fórmico-agua (100:11:11:27)

Revelador: NP-PEG: Reactivo A: Reactivo NP 1% en metanol B: Solución PEG 4000 (5% en etanol)

RF: 0.38

Placas UV 365 nm**Después de revelar (luz UV 365 nm)****16. ANALISIS MICROBIOLÓGICOS**

Se toman 10 g y se adicionan a una bolsa Stomacher Bag con 90 ml de agua peptonada. Se introduce en el equipo mezclador Stomacher 400 durante 30 segundos a 2500 rpm.

Se realizan diluciones seriadas de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} y se toma 1 mL de cada bolsa el cual se adiciona en las cajas con medio de cultivo para obtener los recuentos de microorganismos totales viables, hongos y levaduras, y enterobacterias.

La muestra restante de la bolsa se incuba durante 24h a 37°C y se siembra en agares selectivos para determinar presencia de microorganismos patógenos.

17. ALMACENAMIENTO

Mantener el material vegetal entero seco en bolsas de papel cerrada, protegido de la humedad y contaminantes externos.

18. BIBLIOGRAFIA

1. AVRDC The World Vegetable Center, Bitter gourd IV leaflet N°10
2. Basch E, Gabardi S, Ulbricht C. Bitter melon (*Momordica charantia*): A review of efficacy and safety. American Journal of Health System Pharmacy, vol 60, p.356–359, 2003.
Carlos, L. Contribución al establecimiento de parámetros de calidad y rangos de variación para material vegetal de *Momordica charantia* L. provenientes de individuos silvestres y de cultivo. Tesis de Maestría en Ciencias Farmacéuticas. Universidad Nacional de Colombia, Bogota, 2014.
3. Chen, J., Tian, R., Qui, M., Lu, L. Zheng, Y., Zhang, Z. Trincucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. China. Phytochemistry 69 p 1043–1048. 2008.
4. Felix, P., Coronel, V., Proyecto de cultivo de plantas medicinales (*Momordica charantia*, Achochilla), con mujeres microagricultoras con especial atención a la viabilidad

financiera). Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas, Escuela Superior Politécnica del litoral. p. 35-37, 2010.

5. Grover, J.K., Yadav, S.P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. India. Journal of ethnopharmacology .p 123-132, 2004.

6. Hulin, A., Wavelet, M. and Desbordes, J.M.: Intoxication aigue par *Momordica charantia* (sorrossi). A propos de deux cas. *Semaine des bopitaux* 64 (44): p. 2847-2848, 1988.

7. Keller, C., Ma, J., Kavalier, A., He, K., Brillantes, A., Kennelly, E., et al A. Saponins from the traditional medicinal plant *Momordica charantia* stimulate insulin secretion in vitro , *Phytomedicine* . Vol. 19, p 32-37, DOI:10.1016/j.phymed.2011.06.019), 2011^a.

8. Lagarto, A., Couret, M., Guerra, I., López, R. Toxicidad aguda oral y ensayos de irritación de extractos acuoso e hidroalcohólico de *Momordica charantia* L. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba, 2008.

9. Lin, K.W., Yang, S.C., Lin, C.N., 2011, Antioxidant constituents from the stems and fruits of *Momordica charantia*. *Food Chemistry* 127, 609-614

10. Liu, C.H., Yen, M.H., Tsang, S.F., Gan, K.H., Hsu, H.Y., Lin, C.N., Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. *Food Chemistry* 118, 751-756. 2010.

11. Ministerio de la Protección Social, Vademecum colombiano de plantas medicinales., Bogotá. 2008.

12. Raman, A., Lau, C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Phytomedicine* Vol. 2 (4), p 349-362. 1996.

13. Robineau, Lionel , *Farmacopea vegetal caribeña*, Enda Caribe, p 292-296. 2007.

14. Ross, Ivan A., *Medicinal plants of the world*, Humana press., Second edition Volume 1. p-337-365, 2003.

15. Taylor, L., Technical data report for Bitter Melon (*Momordica charantia*). en: *Herbal secrets of the rainforest*. second edition Sage Press, p.73. 2002.

16. Yadav, M., Lavania, A., Tomar , R. Complementary and comparative study on hypoglycemic and antihyperglycemic activity of various extracts of *Eugenia jambolana* seed, *Momordica charantia* fruits, *Gymnema sylvestre*, and *Trigonella foenumgraecum* seeds in rats. *Appl. Biochem. Biotechnology*. p 2388–2400, 2010.

17. Yukes, J., Balick, M., *Dominican medicinal plants: a guide for health care providers*, second edition- a web text version, New York, p-246-249, 2010.

18. Yuwai, K., Rao, K., Kaluwin, C., Jones, G., Rivett D., *Chemical Composition of Momordica charantia* L. Fruits, *J. Agric Food Chem.*, 39, p. 1762-1763, 1991.

19. World Health organization WHO, *Quality control of methods for herbal material*, Malta, ISBN 978 92 4 150073 9. 2011.

8. BIBLIOGRAFÍA

1. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, Farmacopeia brasileira, quinta edición, Brasília, 2010, Volumen 1 y 2.
2. Ahmad, N., Hassan, M.R., Halder, H., Bennoor, K.S., Effect of *Momordica charantia* (Karolla) extracts on fasting and postprandial serum glucose levels in NIDDM patients. Bangladesh Medical Research Council Bulletin 25, p. 11–13, 1999.
3. Ahmed, I., Adeghate, E., Sharma, A.K., Pallot, D.J., Singh, J., Effects of *Momordica charantia* fruit juice on islet morphology in the pancreas of the streptozotocin-diabetic rat. Diabetes Research Clinical Practices 40, p. 145–151, 1998.
4. Ahmed, I., Lakhani, M.S., Gillett, M., John, A., Raza, H., Hypotriglyceridemic and hypocholesterolemic effects of anti-diabetic *Momordica charantia* (karela) fruit extract in streptozotocin-induced diabetic rats. Diabetes Research Clinical Practices 51, p. 155–161, 2001.
5. Akhtar, M.S., Trial of *Momordica charantia* Linn (karela) powder in patients with maturity-onset diabetes. Journal of Pakistan Med Association 32, p. 106–107, 1982.
6. Al-Habori M and Raman A. Antidiabetic and hypocholesterolemic effects of fenugreek [Review]. Phytother Res; 12: p. 233-242, 1998.
7. Ali, L., Khan, A.K., Mamun, M.I., Mosihuzzaman, M., Nahar, N., Nur-e-Alam, M., Rokeya, B., Studies on hypoglycemic effects of fruit pulp, seed, and whole plant of *Momordica charantia* on normal and diabetic model rats. Planta Medicine 59, p. 408–412, 1993.
8. Alonso, M.J. Plantas medicinales: del uso tradicional al criterio científico. Barcelona. p. 40-42, 2010.
9. American diabetes association, Diagnosis and classification of diabetes mellitus Diabetes care, v29, p. S43-S48, 2006.
10. Anderson JW, Allgood LD, Turner J, Oeltgen PR, Daggy BP. Effects of psyllium on glucose and serum lipid response in men with type 2 diabetes and hypercholesterolemia. Am J Clin Nutr; 70: p. 466-473, 1999.
11. Anderson R.A., Cheng N, Bryden N.A., Polansky M.M., Cheng N., Chi J, Feng J. Beneficial effects of chromium for people with diabetes. Diabetes; 46: p. 1786-1791, 1997.
12. Andrade, S. , Duque, D., Jaramillo, D. *Momordica charantia* como alternativa terapéutica en la medicina veterinaria. Rev Sist Prod Agroecol. 3: 2: p. 15-35, 2012.

13. Aschner, P. Epidemiología de la Diabetes en Colombia. Avances en Diabetología. 26 , 95-100, 2010.
14. Attele A.S, Zhou Y-P, Xie J-T, Wu JA, Zhang L, Dey L, *et al.* Antidiabetic effects of Panax ginseng berry extract and the identification of an effective component. Diabetes; 51: p. 1851-1858, 2002.
15. AVRDC The World Vegetable Center, Bitter gourd IV leaflet N°10
16. Avalos, S. Experiencias para observar el fenómeno de fluorescencia con luz ultravioleta. Revista Eureka sobre Enseñanza y Divulgación de las Ciencias. España, vol. 5, pp. 377-381, 2008.
17. Baldwa, V.S., Goyal, R.K., Bhandari, C.M., Pangariya, A., A clinical trial of insulin obtained from the vegetable source (plant insulin) in patients with diabetes mellitus. Rajasthan Medical Journal 16, p. 54, 1976.
18. Bailey, C.J., Day, C., Turner, S.L., Leatherdale, B.A., Cerasee, a traditional treatment for diabetes. Studies in normal and streptozotocin diabetic mice. Diabetes Research 2, 81–84, 1985.
19. Basch E, Gabardi S, Ulbricht C. Bitter melon (*Momordica charantia*): A review of efficacy and safety. American Journal of Health System Pharmacy, vol 60, p.356–359, 2003.
20. Baskaran K, Kizar B, Ahamath K, Radma Shanmugasundaram K, Shanmugasundaram ERB. Antidiabetic effect of a leaf extract from *Gymnema sylvestre* in non-insulin-dependent diabetes mellitus patients. J Ethnopharmacol; 30: p. 295-306, 1990.
21. Battelli, M.G., Polito, L., Bolognesi, A., Lafleur, L., Fradet, Y., Stirpe, F., Toxicity of ribosome-inactivating proteins-containing immunotoxins to a human bladder carcinoma cell line. International Journal of Cancer 68, p. 485–490, 1996.
22. Bharathi, L., Joseph, J., *Momordica* Genus in Asia: An overview. Springer India, p.1-6, 38. ISBN 978-81-322-1032 0, 2013.
23. Beltran, C., Diaz, F., Gomez, H. Tamizaje fitoquímico preliminar de especies de plantas promisorias de la costa atlántica colombiana. Rev Cubana Plant Med, Ciudad de la Habana, V 18, N°4, 2013. Disponible en http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000400013&lng=es&nrm=iso. accedido en 19 oct. 2014
24. Bermúdez, A., Oliveira, M., Velázquez, D. La Investigación etnobotánica sobre plantas medicinales: Una revisión de sus objetivos y enfoques actuales. *INCI*, vol.30, no.8, p.453-459. ISSN 0378-1844, 2005.
25. British Pharmacopoeia Commission, British pharmacopoeia 2014 online, URL: www.pharmacopoeia.co.uk.
26. Blumenthal, M. The complete German commission E monographs. Therapeutic guide to herbal medicines. American Austin, Texas: Botanical Council, 1998.

27. Cakici, I., Hurmoglu, C., Tunctan, B., Abacioglu, N., Kanzik, I., Sener, B., Hypoglycaemic effect of *Momordica charantia* extracts in normoglycaemic or cyproheptadine-induced hyperglycaemic mice. *Journal of Ethnopharmacology* 44, 117–121, 1994.
28. Cañigüeral, S. La Fitoterapia: ¿Una terapéutica para el tercer milenio?. *Revista de fitoterapia* v2, p. 101-121, 2002.
29. Cañigüeral, S.; Dellacassa, E.; Bandoni, A.L. Plantas medicinales y Fitoterapia: indicadores de dependjaponesa encia o factores de desarrollo?. *Acta Farm. Bonaer.*, v.22, p.265-278, 2003.
30. Cañigüeral, S., Discurs llegit en l'acte d'ingrés de l'Acadèmic Numerari Molt Il·lustreDr. Salvador Folcarà celebrat; Barcelona, 2013. ISBN: 978-84-695-8757-7
31. Carretero ME, Ortega T, Sánchez D. *Gymnema sylvestre*, una droga hipoglucemiante. *Revista de Fitoterapia*; 1 (4): p. 259-269, 2001.
32. Chattopadhyay RR. Possible mechanism of antihyperglycemic effect of *Gymnema sylvestre* leaf extract. *Gen Pharmacol*; 31: p. 495-496, 1998.
33. Chen, J., Tian, R., Qui, M., Lu, L. Zheng, Y., Zhang, Z. Trinorcucurbitane and cucurbitane triterpenoids from the roots of *Momordica charantia*. *China. Phytochemistry* 69 p 1043–1048. 2008.
34. Chen, J. C., Liu, W. Q., Lu, L., Qiu, M. H., Zheng, Y. T., Yang, L. M., ... & Li, Z. R. Kuguacins F–S, cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia* L. *Phytochemistry*, 70(1), 133-140, 2009.
35. Cignarella A, Nastasi M, Cavalli E, Puglisi L. Novel lipid lowering properties of *Vaccinium myrtillus* L. leaves, a traditional antidiabetic treatment, in several models of rat dyslipidaemia: a comparison with ciprofibrate. *Thromb Res* 84: p. 311-322, 1996.
36. Costa, J., Nascimento, E., Campos, A. Antibacterial activity of *Momordica charantia*(Curcubitaceae) extracts and fractions, *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, Vol2, P.45-51, 2011.
37. Day, C, Cartwright, T., Provost, J. and Bailey, C, Hypoglycaemic effect of *Momordica charantia* extracts. *Planta Med.* 56: p. 426-429, 1990.
38. Díaz, J.A. Informe Técnico. Caracterización del mercado colombiano de plantas medicinales y aromáticas. Instituto Alexander von Humboldt - El Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial 111 P. Bogotá D.C., Colombia, 2003.
39. Dilawari JB, Kamat PS, BAtta RP, Mukewar S, Reghavan S. Reduction of postprandial plasma glucose by Bengal gram dhal (*Cicer arietnum*) and Rajmah (*Phaseolus vulgaris*). *Am J Clin Nutr*; 34; p. 2450.2453,1981.

40. Encuesta nacional de plantas medicinales y aromáticas una aproximación al mercado de las PMYA en Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2001.
41. Frame, A.D., Rios-Olivares, E., De Jesus, L., Ortiz, D., Pagan, J., Mendez, S., Plants from Puerto Rico with anti-*Mycobacterium tuberculosis* properties. *Puerto Rico Health Science Journal* 17, p. 243–252. 1998.
42. Felix, P., Coronel, V., Proyecto de cultivo de plantas medicinales (*Momordica charantia*, Achochilla), con mujeres microagricultoras con especial atención a la viabilidad financiera). Instituto de Ciencias Humanísticas y Económicas, Escuela Superior Politécnica del litoral. p. 35-37, 2010.
43. Fletcher JI, Dingley AJ, Smith R, Connor M, Christie MJ, King GF. High-resolution solution structure of gumarin, a sweet-taste-suppressing plant polypeptide. *Eur J Biochem*; 264: p. 525-533, 1999.
44. Fonnegra R., Jiménez S. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Segunda edición. p.11-15.1999.
45. Fushiki T, Kojima A, Imoto T, Inoue K, Sugimoto E. An extract of *Gymnema sylvestre* leaves and purified gymnemic acid inhibits glucose-stimulated gastric inhibitory peptide secretion in rats. *J Nutr* 122:p. 2367-2373, 1992.
46. Ganguly, C., De, S., Das, S., Prevention of carcinogen-induced mouse skin papilloma by whole fruit aqueous extract of *Momordica charantia*. *European Journal of Cancer Prevention* 9, p. 283–288, 2000.
47. Giner, E., Castillo, E., Fitoterapia y Diabetes. *Revista de Fitoterapia*, V3, p 113-122, 2003.
48. Grover, J.K., Rathi, S.S., Vats, V., Amelioration of experimental diabetic neuropathy and gastropathy in rats following oral administration of plant (*Eugenia jambolana*, *Mucuna pruriens* and *Tinospora cordifolia*) extracts. *Indian Journal of Experimental Biology* 40, p. 273–276, 2002.
49. Grover, J.K., Yadav, S.P. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *India. Journal of ethnopharmacology* .p 123-132, 2004.
50. Guevara, H., Luengas, P., Garavito, G. Revisión documental de los productos naturales legalmente autorizados para su mercadeo en Colombia. *Colomb. Med.* [online]., vol.41, n.2 [citado 2012-06-02], p. 129-140, 2010. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1657-5342010000200004&lng=es&nrm=iso>. ISSN 1657-9534.
51. Habicht, S. D., Kind, V., Rudloff, S., Borsch, C., Mueller, A. S., Pallauf, J.. & Krawinkel, M. B. Quantification of antidiabetic extracts and compounds in bitter gourd varieties. *Food chemistry*, 126 (1)p. 172-176, 2011.
52. Harborne, J. "Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis".

Second edition. London: Chapman and Hall. 1984.

53. Harnischfeger, G. Standardization and Quality Control of Medicinal Plants and their Products. UNIDO-ICS Training Course on: Development, quality assurance and regulatory aspects of herbal medicinal products; Panama City, Panama 21. - 25. November 2005.
54. Hikino H, Ishiyama M, Suzuki Y, Kono C. Mechanism of hypoglycemic activity of ganoderan B: A glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med*; 55: p. 423-428, 1989.
55. Hikino H, Konno C, Mirin Y, Hayashi T. Isolation and hypoglycemic activity of ganoderans A and B, glycans of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med*; 4: p. 339-340, 1985.
56. Hirotani M, Ito C. Ganoderic acids T, S and R, new triterpenoids from the cultured mycelia of *ganoderma lucidum*. *Chem Pharm Bull*; 95: p. 2282-2285, 1986.
57. Higashino, H., Suzuki, A., Tanaka, Y., Pootakham, K., Hypoglycemic effects of Siamese *Momordica charantia* and *Phyllanthus urinaria* extracts in streptozotocin-induced diabetic rats (the 1st report)]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 100, 415–421, 1992.
58. Hulin, A., Wavelet, M. and Desbordes, J.M.: Intoxication aigue par *Momordica charantia* L.(sorrossi). A propos de deux cas. *Semaine des bopitaux* 64 (44): p. 2847-2848, 1988.
59. Instituto nacional de vigilancia de medicamentos y alimentos INVIMA. Página web: www.invima.gov.co. Fecha de la última actualización: 14 de junio de 2012, Fecha de consulta: 12 de Abril de 2012.
60. International Diabetes Federation. IDF Diabetes Atlas, sixth edition, 2013. ISBN: 2-930229-85-3 . Version Online of IDF Diabetes Atlas:www.idf.org/diabetesatlas.
61. Jayasooriya, A.P., Sakono, M., Yukizaki, C., Kawano, M., Yamamoto, K., Fukuda, N., Effects of *Momordica charantia* powder on serum glucose levels and various lipid parameters in rats fed with cholesterol free and cholesterol-enriched diets. *Journal of Ethnopharmacology* 72, p. 331–336, 2000.
62. Kamei K, Tacaño R, Miyasaka A, Imoto T, Hara S. Aminoacid sequence of sweet-tast-suppressing peptide (gurmarin) from the leaves of *Gymnema sylvestre*. *J Biochem*; 111: p. 109-112, 1992.
63. Kaij-a-Kamb M, Amoros M, Girre L. The chemistry and biological activity the genus *Centaurea*. *Pharm Acta Helv*; 7: p. 178-188, 1992.
64. Kar, A., Choudhary, B.K., Bandyopadhyay, N.G., Comparative evaluation of hypoglycaemic activity of some Indian medicinal plants in alloxan diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology* 84, p.105–108, 2003.
65. Karunanayake, E.H., Jeevathayaparan, S., Tennekoon, K.H., Effect of *Momordica charantia* fruit juice on streptozotocin-induced diabetes in rats. *Journal of Ethnopharmacology* 30, p. 199–204, 1990.

66. Khaleeva L.D., Maloshtan L.N., Sytnik A.G.. Comparative evaluation of the hypoglycemic activity of the vegetal complex of *Paseolus vulgaris* and chlorpropamide in experimental diabetes. Probl. Endokrinol. Mosk.,2; p. 69-71, 1987.
67. Keller, C., Ma, J., Kavalier, A., He, K., Brillantes, A., Kennelly, E., et al A. Saponins from the traditional medicinal plant *Momordica charantia* stimulate insulin secretion in vitro , Phytomedicine . Vol. 19, p 32-37, DOI:10.1016/j.phymed.2011.06.019), 2011^a.
68. Keller, A. C., et al. Saponins from the traditional medicinal plant *Momordica charantia* stimulate insulin secretion in vitro. Phytomedicine, vol. 19, no 1, p. 32-37, 2011^b
69. Khan, M.R., et al., *Momordica charantia* and *Allium sativum*: broadspectrum antibacterial activity. Korean Journal of Pharmacognosy 29, p. 155–158, 1998.
70. Khanna, P., Jain, S.C., Panagariya, A., Dixit, V.P., Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source. Journal of Natural Products 44, p.648–655, 1981.
71. Kedar, P., Chakrabarti, C.H., Effects of bittergourd (*Momordica charantia*) seed & glibenclamide in streptozotocin induced diabetes mellitus. Indian Journal of Experimental Biology 20, 232–235, 1982.
72. Landin K, Holm G, Tengborn L, Smith U. Guar gum improves insulin sensitivity, blood lipids, blood pressure, and fibrinolysis in healthy men. Am J Clin Nutr; 56: p. 1061-1065, 1992.
73. Lagarto, A., Couret, M., Guerra, I., López, R. Toxicidad aguda oral y ensayos de irritación de extractos acuoso e hidroalcohólico de *Momordica charantia* L. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba, 2008.
74. Leatherdale, B.A., Panesar, R.K., Singh, G., Atkins, T.W., Bailey, C.J., Bignell, A.H., Improvement in glucose tolerance due to *Momordica charantia* (karela). Brazilian Medical Journal (Clinical Research Edition) 282, p. 1823–1824. 1981.
75. Lima, P. Avaliação da atividade de extratos de folhas de *Momordica charantia*, *Auxemma onocalyx* e *Ziziphus joazeiro* sobre bactérias e larvas de *Culex quinquefasciatus*. Tesis de maestria en ciencia animal – Universidade Federal Rural do Semi-Árido,UFERSA, Brasil. p 20, 2008.
76. Li, Q.Y., Liang, H., Chen, H.B., Wang, B., Zhao, Y.Y., 2007. A new cucurbitane triterpenoid from *Momordica charantia*. Chinese Chemical Letters 18, 843-845.
77. Lin, K.W., Yang, S.C., Lin, C.N., 2011. Antioxidant constituents from the stems and fruits of *Momordica charantia*. Food Chemistry 127, 609-614.
78. "Lingzhi". En: Chang HM, But RPH (Eds.) Pharmacology and Application of Chinese Materia Medica, Singapore: World Scientific Vol. I, p 642 653, 1986.
79. Liu, C.H., Yen, M.H., Tsang, S.F., Gan, K.H., Hsu, H.Y., Lin, C.N., Antioxidant triterpenoids from the stems of *Momordica charantia*. Food Chemistry 118, 751-756. 2010.

80. Licastro, F., Franceschi, C., Barbieri, L., Stirpe, F., Toxicity of *Momordica charantia* lectin and inhibitor for human normal and leukaemic lymphocytes. *Virchows Archives of B Cell Pathology Including Molecular Pathology* 33, p. 257–265, 1980.
81. Lolitkar MM, Rajarama Rao MR. Pharmacology and hypoglycaemic principle isolated from the fruits of *Momordica charantia* L. *Indian J Pharmacy*; 28: p. 129-133, 1966.
82. López, L., González, D., Gómez, J.A., Albarracín, C. Agenda prospectiva de investigación y desarrollo tecnológico para la cadena productiva de plantas aromáticas, medicinales, condimentarias y afines con énfasis en ingredientes naturales para la industria cosmética de Colombia. Bogotá, 2009.
83. Luengas-Caicedo, P.E., Castro Braga, F., Brandão, G.C., Braga de Oliveira, A. Seasonal and intraspecific variation of flavonoids and proanthocyanidins in *Cecropia glaziovii* Sneth. leaves from native and cultivated specimens. *Zeitschrift Für Naturforschung C-A Journal Of Biosciences*, Tuebingen, v. 62c, n. 9/10, p. 701-709, 2007.
84. Mada Z, Abel R, Samish S and Arad J. Glucose-Lowering effect of fenugreek in non-insulin dependent diabetics. *Europ J Clin Nutr*; 42: p. 51-54, 1988.
85. Mahdi Ali A., Chandra, A., Kumar Singh R., Shukla, S., Mishra, L.C., Ahmad, S. Effect of herbal hypoglycemic agents on oxidative stress and antioxidant status in diabetic rats. India. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. p. 8-15 ,2003.
86. Masso JL, Adzet T. Actividad hipoglucemiante de *Centaurea aspera* L. *Rev Esp Fisiol*; 4: p. 313-316, 1976.
87. Mikaelle, E. Prospecção química e avaliação das atividades biológicas de *Momordica charantia* L. (Curcubitaceae). Universidade regional do cariri – URCA centro de ciências biológicas e da saúde – ccbs departamento de ciências físicas e biológicas – dcb curso de ciências biológicas, p. 40-41, 2010.
88. Ministerio de protección social, Decreto 2266 de 2004 “por el cual se reglamentan los regímenes de registros sanitarios, y de vigilancia y control sanitario y publicidad de los productos fitoterapéutico”, 2004.
89. Ministerio de protección social, Decreto 3553 de 2004 “Por el cual se modifica el Decreto 2266 de 2004 y se dictan otras disposiciones”. 2004.
90. Ministerio de la Protección Social, Vademecum colombiano de plantas medicinales., Bogotá. 2008.
91. Ministry of Health, The Japanese Pharmacopoeia JP, sixteenth edition, 2012.
92. Murakami N, Murakami T, Kadoya M, Matsuda H, Yamahara J, Yoshikawa M. New hypoglycemic constituents in "gymnemic acid" from *Gymnema sylvestre*. *Chem Pharm Bull*. p. 44: 469-471, 1996.
93. Naval V, Gómez-Serranillos M.P., Carretero M.E., Villar A.M.. Ginseng. *Revista de Fitoterapia*; 2 (2) p. 123-138, 2002.

94. Ng, T.B., Liu, W.K., Sze, S.F., Yeung, H.W., Action of alpha momorcharin, a ribosome inactivating protein, on cultured tumor cell lines. *General Pharmacology* 25, p. 75–77, 1994.
95. Nobre, C.P, Raffin F.N., Moura, T. F. Standardization of extracts from *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae) by Total Flavonoids Content Determination. *Acta Farm. Bonaerense* 24 (4) .Brasil. p.562-566, 2005.
96. Ogata, F., Miyata, T., Fujii, N., Yoshida, N., Noda, K., Makisumi, S., Ito, A., Purification and amino acid sequence of a bitter melon inhibitor against an acidic amino acid-specific endopeptidase of *Streptomyces griseus*. *Journal of Biological Chemistry* 266, p.16715–16721. 1991.
97. Okabayashi Y, Tani S, Fujisawa T, Koide M, Hasegawa H, Nakamura T, Fujii M, Otsuki M. Effect of *Gymnema sylvestre*, R.Br. on glucose homeostasis in rats. *Diabetes Res Clin Pract.*; 9: p.143-148, 1990.
98. Omoregbe, R.E., Ikuebe, O.M., Ihimire, I.G., Antimicrobial activity of some medicinal plants extracts on *Escherichia coli*, *Salmonella paratyphi* and *Shigella dysenteriae*. *African Journal of Medical Science* 25, p. 373–375, 1996.
99. Oviedo, M., Espinosa, F., Reyes, H., Trejo, J., Gil, E., Guía clínica para el diagnóstico y tratamiento de la diabetes mellitus tipo 2. *Revista médica IMSS*, v41, p-S27-S46, 2003.
100. Pari, L., Ramakrishnan, R., Venkateswaran, S., Antihyperglycaemic effect of Diamed, a herbal formulation, in experimental diabetes in rats. *Journal of Pharmacy Pharmacology* 53, p. 1139–1143, 2001.
101. Patil, S. A., Patil, S. B. Toxicological studies of *Momordica charantia* Linn. seed extracts in male mice. *Int J Morphol*, 29(4), 1212-1218, 2011.
102. Persaud SJ, Al-Majed H, Raman A, Jones PM. *Gymnema sylvestre* stimulates insulin release in vitro by increased membrane permeability. *J Endocrinol*; 163: p. 207-212. 1999.
103. Peris JB, Stübing G, Vanaclocha B. *Fitoterapia Aplicada*. M.I.C.O.F. Valencia: Valencia, 1995.
104. Pereira, O.R, Estudio estructural y determinación de propiedades oxidativas de extractos etanolicos de *thymus citriodorus* y *Cytisus multiflorus*. Universidad de Salamanca. Facultad de farmacia. Departamentos de Bioquímica y Biología molecular. p.p 42-43, 2009.
105. Pitipanapong ,J. , Chitprasert, S., Goto M., Jiratchariyakul,W., Sasaki, M., Shotipruk, A. New approach for extraction of charantin from *Momordica charantia* with pressurized liquid extraction. *Tailandia. Separation and Purification Technology* 52. p.416–422. 2007.
106. Raman, A., Lau. C. Anti-diabetic properties and phytochemistry of *Momordica charantia* L. (Cucurbitaceae). *Phytomedicine* Vol. 2 (4), p 349-362. 1996.
107. Rathi, S.S., Grover, J.K., Vats, V., The effect of *Momordica charantia* and *Mucuna pruriens* in experimental diabetes and their effect on key metabolic enzymes involved in carbohydrate metabolism. *Phytotherapy Research* 16, p. 236–243. 2002.

108. Riales R, Albrinck MJ, Effect of chromium chloride supplementation on glucose tolerance and serum lipids including high-density lipoprotein of adult men. *Am J Clin Nutr*; 34,p. 2670-2678, 1981.
109. Robineau, Lionel , *Farmacopea vegetal caribeña*, Enda Caribe, p 292-296. 2007.
110. Ross, Ivan A., *Medicinal plants of the world*, Humana press., Second edition, Volume 1. p-337-365, 2003.
111. Rodrigues, K., Noletto, C., Catunda, J., Machado, C., Santos, J., Fernandes, D., *Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de Momordica charantia L.* *Cad. Pesq.*, São Luís, V 17, N°2, Agosto, 2010.
112. Sarkar, S., Pranava, M., Marita, R. Demonstration of the hypoglycemic action of *Momordica charantia* in a validated animal model of diabetes. *India. Pharmacological Research*, Vol. 33, No. 1, 1996.
113. Sharma, V. N., Sogani, R. K. and Arora, R. B.: Some observations on hypoglycaemic activity of *Momordica charantia* . *Indian .Med. Res.* 48: 471-477 , 1960.
114. Sharma RD, Raghuram TC, Rao NS. Effect of fenugreek seeds on blood glucose and serum lipids in type I diabetes. *Eur J Clin Nutr*; 44: p. 301–30, 1990.
115. Shanmugasundaram ERB, Rajeswari G, Baskaran K, Rajesh Kumar BR, Radha Shanmugasundaram K, Kizar Ahmath B. Use of *Gymnema sylvestre* leaf extract in the control of blood glucose in insulin-dependent diabetes mellitus. *J Ethnopharmacol*; 30: p. 281-294, 1990.
116. Salomón, S., López, Hernández, González O., Sanabria , M. Desarrollo de una tecnología para la obtención de extracto acuoso de *Momordica charantia* L. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). La Habana, Cuba. 2011.
117. Sanabria, A. Análisis fitoquímico preliminar. Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia. 113p.1983.
118. Sharapin, N. Fundamentos de tecnología de productos fitoterapéuticos. Vol 78. Convenio Andres Bello. p 143-156. 2000^a.
119. Sharapin, N. Materias primas vegetales para la industria de productos fitofarmacéuticos. *Revista de fitoterapia*, 1 (3). P. 197-203, 2000^b.
120. Shibib, B.A., Khan, L.A., Rahman, R.. Activity of *Coccinia indica* and *Momordica charantia* in diabetic rats: depression of the hepatic gluconeogenic enzymes glucose-6-phosphatase and fructose-1,6- bisphosphatase and elevation of both liver and red-cell shunt enzyme glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry Journal* 292, p. 267–270, 1993.

121. Singh, N., Tyagi, S.D., Agarwal, S.C., Effects of long term feeding of acetone extract of *Momordica charantia* (whole fruit powder) on alloxan diabetic albino rats. *Indian Journal of Physiology Pharmacology* 33, p. 97–100, 1989.
122. Sitasawad, S.L., Shewade, Y., Bhonde, R., 2000. Role of bittergourd fruit juice in stz-induced diabetic state in vivo and in vitro. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 71–79.
123. Sotaniemi EA, Haapakoski E, Rautio A. Ginseng therapy in non-insulin-dependent diabetic patients. *Diabetes Care*; 18: p. 1373-1375, 1995.
124. Sun, Y., Huang, P.L., Li, J.J., Huang, Y.Q., Zhang, L., Huang, P.L., Lee-Huang, S.,. Anti-HIV agent MAP30 modulates the expression profile of viral and cellular genes for proliferation and apoptosis in AIDS-related lymphoma cells infected with Kaposi's sarcoma associated virus. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 287,p. 983–994, 2001.
125. Suzuki Y, Hikino H. Mechanisms of hypoglycemic activity of panaxans A and B, glycans of *Panax ginseng* roots: Effects on plasma levels, secretion, sensitivity and binding of insulin in mice. *Phytother Res*; 3: p. 20- 24, 1989.
126. Tawaha, K., Alali, F., Gharaibeh, M., Mohammad, M., Elelimat, T., Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plants species. *Food chemistry*. Vol 104. P. 1372-1378, 2007
127. Tamayo, D. Diabetes en Colombia: descripción de la epidemiología actual. ODC. p 1-13, 2012.
128. Taylor, L., Technical data report for Bitter Melon (*Momordica charantia*). en: *Herbal secrets of the rainforest*. second edition Sage Press, p.73. 2002.
129. Tennekoon, K. H., j ccvath ayaparan, S., Angunawala, P., Karunanayake, E. H. and] ayasinghe, K.S. A.: Effect of *Momordica charantia* on key hepatic enzymes. *J. Ethnopharmacol.* 44:93-97, 1994.
130. Tomoda M, Shimizu N, Oshima Y, Takahashi M, Murakami M, Hikino H. Hypoglycemic activity of twenty plant mucilages and three modified products. *Planta Med*; 53: p. 8-12, 1987.
131. Trease, G.E, Evans, W.C, Trease and Evans pharmacognosy. Edition 15, ISBN:0702026174, 9780702026171, W.B. Saunders, 2002.
132. United States of America, United States Pharmacopeia, USP, USP 37/NF 32, Rockville, USA, 2014.
133. Vanaclocha B., Cañigüeral S. (eds). *Fitoterapia, Vademécum de prescripción*. Barcelona; Masson, 2003.
134. Viridi, J., Sivakami, S., Shahani, S., Suthar, A.C., Banavalikar, M.M., Biyani, M.K. Antihyperglycemic effects of three extracts from *Momordica charantia*. *India. Journal of Ethnopharmacology*. p 107–111, 2003.

135. Wagner, H., Bladt, S., Zgainski, E. Plant drug analysis : A thin layer chromatography, Atlas Springer-Verlag, 1984.
136. Waksmundzka, M., Sherma, T., Kowalska, T. Thin layer chromatography in phytochemistry. CRC Press, New York, Vol 99, p.512-531, 2008.
137. Welihinda J, Arvidson G, Gylfe E, Hellman B, Goyal RK. The insulin-releasing activity of the tropical plant *Momordica charantia*. Acta Biol Med Germ; 417: p. 1229-1240, 1982.
138. Welihinda J, Karunanaya E, Sheriff MHB, Jayasinghe K. Effect of *Momordica charantia* on the glucose tolerance in maturity onset diabetes. J Ethnopharm; 17: p. 277-82, 1986.
139. World Health Organization. *WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues*, World Health Organization Geneva, p 27, 2007.
140. World Health organization WHO monographs on selected medicinal plants. Vol 4. Geneva. p 192-209, 2009.
141. World Health organization WHO, Quality control of methods for herbal material, Malta, ISBN 978 92 4 150073 9. 2011.
142. Yadav, M., Lavania, A., Tomar, R. Complementary and comparative study on hypoglycemic and antihyperglycemic activity of various extracts of *Eugenia jambolana* seed, *Momordica charantia* fruits, *Gymnema sylvestre*, and *Trigonella foenumgraecum* seeds in rats. Appl. Biochem. Biotechnology. p 2388–2400, 2010.
143. Yesilada, E., Gurbuz, I., Shibata, H., Screening of Turkish antiulcerogenic folk remedies for anti-*Helicobacter pylori* activity. Journal of Ethnopharmacology 66, p. 289–293, 1999.
144. Yuan, X., Gu, X., Tang, J., 2008. Purification and characterisation of a hypoglycemic peptide from *Momordica Charantia* L. Var. abbreviata Ser. Food Chemistry 111, 415-420.
145. Yukes, J., Balick, M., Dominican medicinal plants: a guide for health care providers, second edition- a web text version, New York, p-246-249, 2010.
146. Yuwai, K., Rao, K., Kaluwin, C., Jones, G., Rivett D., Chemical Composition of *Momordica charantia* L. Fruits, J. Agric Food Chem., 39, p. 1762-1763, 1991.
147. Zhang, Q.c.: Preliminary report on the use of *Momordica charantia* extract by HIV Patients Naturpath. Med.p. p. 65-69, 1992.
148. Zocoler, A., Mathias, K., Palazzo, J., Marques, L., Contribuição ao Controle de Qualidade Farmacognóstico das Folhas e Caules de Melão-de-São Caetano (*Momordica charantia* L. - Cucurbitaceae). Acta Farm. Bonaerense 25, p 22-27, 2006.